

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 982**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2019** **PCT/IB2019/059029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2020** **WO20084496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2019** **E 19875615 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025** **EP 3870211**

54 Título: **Proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (glp1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (gdf15) y usos de las mismas**

30 Prioridad:

22.10.2018 US 201862748603 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2025

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UNLIMITED
COMPANY (100.00%)
Barnahely, Ringaskiddy
Co Cork, IE**

72 Inventor/es:

**RANKIN, MATTHEW M.;
LIN-SCHMIDT, XIEFAN;
HUANG, CHICHI;
FURMAN, JENNIFER;
ZHENG, SONGMAO;
RANGWALA, SHAMINA;
NELSON, SERENA M. y
MULLICAN, SHANNON**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 011 982 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (glp1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (gdf15) y usos de las mismas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se dirige en general a nuevas proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 modulan el GLP1R y/o el GDF15R. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos para el uso de las mismas. Las nuevas proteínas de fusión GLP1-GDF15 son útiles para prevenir, tratar o mejorar enfermedades y trastornos, como la obesidad, la diabetes de tipo 2, el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la dislipidemia, entre otros.

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 62/784,603, presentada el 22 de octubre de 2018.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

Esta solicitud contiene un listado de secuencias, que se presenta electrónicamente a través de EFS-Web como un listado de secuencias en formato ASCII con un nombre de archivo "PRD3474 Sequence Listing", una fecha de creación del 14 de octubre de 2019 y que tiene un tamaño de 327 kb. El listado de secuencias enviado a través de EFS-Web forma parte de la memoria descriptiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

GDF15, un miembro de la familia TGFβ, es una proteína secretada que circula en el plasma como un homodímero de 25 kDa y provoca su función biológica a través de la interacción con el receptor expresado en el tronco encefálico GFRAL (Mullican et al., Nat Med. 23:1150-7 (2017), Yang et al., Nat Med. 23:1158-66 (2017), Hsu et al., Nature 550:255-9 (2017), Emmerson et al., Nat Med 23:1215-9 (2017)). Los niveles en plasma de GDF15 varían entre 150 y 1150 pg/ml en la mayoría de los individuos (Tsai et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 3:239-43 (2012)). Los niveles en plasma elevados de GDF15 se asocian a la pérdida de peso por anorexia y caquexia en el cáncer, y en la insuficiencia renal y cardíaca. Además, GDF15 está aumentado en pacientes que experimentan pérdida de peso después de cirugía de bypass gástrico en Y de Roux (RYGB) (Vila et al., Clin Chem 57:309-16 (2011)).

La correlación entre la pérdida de peso y el GDF15 se conserva en los roedores. La sobreexpresión de GDF15 da como resultado una disminución de la ingesta de alimentos, un menor peso corporal y protege a los ratones de la obesidad, la esteatosis hepática y la intolerancia a la glucosa tras la alimentación con una dieta rica en grasas (Baek et al., Gastroenterology 131:1553-60 (2006), Johnen et al., Nat Med 13:1333-40 (2007), Chrysovergis et al., Int J Obesity 38:1555-64 (2014), Macia et al., PloS One 7:e34868 (2012), Jones et al., Cell Reports 22:1522-30 (2018), Xiong et al., Sci Trans Med 9:412 (2017)). Los xenoinjertos de células tumorales de próstata transfectadas con GDF15 también disminuyen la ingesta de alimentos y el peso corporal (Johnen et al., Nat Med 13:1333-40 (2007)). Por el contrario, numerosos investigadores han informado de que los ratones que carecen de GDF15 ganan más peso y tienen mayor masa de grasa que los animales de tipo salvaje (Strelau et al., J Neurosci 29:13640-8 (2009), Casanovas et al., Haematologica 98:444-7 (2013), Bonaterra et al., J Amer Heart Assoc 1:e002550 (2012), Tsai et al., PloS one. 8:e55174 (2013)).

El potencial del GDF15 administrado farmacológicamente para disminuir la ingesta de energía y provocar de este modo la pérdida de peso se ha demostrado en ratones, ratas y monos. Los ratones delgados tratados con GDF15 recombinante comen menos y pierden peso (Johnen et al., Nat Med 13:1333-40 (2007), Hsu et al., Nature 550:255-9 (2017), Mullican et al., Nat Med 23:1150-7 (2017), Tsai et al., Int J Obesity 42:561-71 (2018)). También se observa una disminución de la ingesta de alimentos y del peso corporal en modelos genéticos y de obesidad inducida por dieta en ratas y ratones después de la administración de GDF15 (Johnen et al., Nat Med 13:1333-40 (2007), Hsu et al., Nature 550:255-9 (2017), Mullican et al., Nat Med 23:1150-7 (2017), Yang et al., Nat Med 23:1158-66 (2017), Tsai et al., Int J Obesity 42:561-71 (2018), Xiong et al., Sci Trans Med 9:412 (2017)). La pérdida de peso mediada por tratamiento con GDF15 en ratones obesos inducidos por dieta lleva a mejoras metabólicas que incluyen una homeostasis de la glucosa mejorada y menores triglicéridos y colesterol en plasma. Estos efectos se trasladan a especies superiores, ya que un régimen de tratamiento diario de seis semanas con GDF15 humano recombinante en primates no humanos espontáneamente obesos redujo la ingesta de alimentos, el peso corporal y las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y mejoró la tolerancia a la glucosa (Xiong et al., Sci Trans Med 9:412 (2017)). Además, se había demostrado con anterioridad que la semivida del GDF15 recombinante se prolonga mediante la fusión con la albúmina sérica humana (HSA) y se prevé que sea un agente terapéutico adecuado para la dosificación una vez a la semana en humanos (Mullican et al., Nat Med 23:1150-7 (2017) y Publicación de Patente de Estados Unidos N°

2017/0327560.

El GLP1 es una hormona peptídica derivada de las células enteroendocrinas del intestino que también reduce la ingesta de alimentos, lo que lleva a una pérdida de peso. Esta función está mediada por la interacción con el receptor de GLP1 (GLP1R) dentro del sistema nervioso central y esta interacción ligando/receptor en los tejidos periféricos tiene efectos biológicos adicionales que incluyen la mejora de la secreción de insulina estimulada por glucosa, la supresión de la liberación de glucagón y la ralentización del vaciado gástrico (Druker et al. Cell Met 27:740-56 (2018)). Aprovechando todos estos efectos biológicos, los agonistas del GLP1R mejoran la homeostasis de la glucosa e impulsan la pérdida de peso en humanos. Además, se ha notificado que el tratamiento con agonistas de GLP1R mejora significativamente los resultados cardiovasculares en pacientes diabéticos, aunque el mecanismo exacto aún está por determinar (Lim et al. Trends Endocrinol Metab. 29:238-48 (2018)). Los agonistas terapéuticos del GLP1R son secuencias peptídicas basadas en el GLP1 humano nativo o en el exendin-4 (un péptido aislado de la saliva del lagarto monstruo de Gila) con modificaciones para evitar la escisión enzimática. Los agonistas del GLP1R pueden administrarse a través de plataformas que prolongan la vida media, como la lipídación, el anticuerpo Fc o la albúmina sérica humana (HSA) (Cheang y Moyle, Chem Med Chem 13:662-71 (2018)).

Por tanto, es deseable obtener un análogo de GLP1 o derivado del mismo y/o un análogo de GDF15 o derivado del mismo con una estabilidad metabólica y un perfil farmacocinético mejorados con respecto a GLP1 o GDF15, respectivamente. Tales derivados proporcionarían una modulación del receptor de GLP1 y del receptor de GDF15 con una mayor duración de acción, lo que los haría adecuados como agentes terapéuticos para sujetos que necesitan dicha modulación.

El análisis anterior se presenta únicamente para proporcionar una mejor comprensión de la naturaleza de los problemas a los que se enfrenta la técnica y no debe interpretarse de ninguna manera como una admisión de que dicha referencia constituye el "estado de la técnica" de la presente solicitud.

El documento US 2017/204149 A1 divulga polipéptidos de fusión que comprenden albúmina sérica o una variante funcional de la misma y proteína GDF15 o una variante funcional de la misma y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, métodos de elaboración de los polipéptidos y uso de los polipéptidos.

El documento US 2016/143998 A1 divulga un derivado de un análogo de GLP-1, composiciones farmacéuticas y usos médicos de los derivados.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto general, la invención se refiere a nuevas proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 modulan el GLP1R y/o el GDF15R (GFRAL).

En la presente se proporcionan proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 comprenden, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un péptido GLP1, un primer péptido conector, una proteína albúmina sérica, un segundo péptido conector y una proteína GDF15.

En ciertas realizaciones, el péptido GLP1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:1-4.

En ciertas realizaciones, el primer péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5-25.

En ciertas realizaciones, la proteína albúmina sérica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:26 o la SEQ ID NO:27.

En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:28-30.

En ciertas realizaciones, la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32.

En ciertas realizaciones, la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:33-74 y 84.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican las proteínas de fusión GLP1-GDF15 de la invención. También se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos aislados de la invención. También se proporcionan células huésped que comprenden los ácidos nucleicos aislados de la invención o los vectores de la

invención.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión GLP1-GDF15 de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto con necesidad de ello, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debida a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para reducir la ingesta de alimentos en un sujeto con necesidad de ello.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para modular la actividad del receptor de GLP1 en un sujeto con necesidad de ello.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para modular la actividad del receptor de GDF15 (GFRAL) en un sujeto con necesidad de ello.

También se proporcionan kits que comprenden las proteínas de fusión GLP1-GDF15 de la invención, los ácidos nucleicos aislados de la invención, y/o los vectores de la invención. El kit puede, por ejemplo, comprender además un dispositivo para inyección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente solicitud, se entenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Debe entenderse, sin embargo, que la aplicación no se limita a las realizaciones precisas que se muestran en los dibujos.

La **FIG. 1** muestra un gráfico que demuestra el cambio de peso porcentual (desde el día 0) en ratones DIO que recibieron la administración diaria de liraglutida (lira) y/o la administración en días alternos de HSA-GDF15 (SEQ ID NO: 81).

La **FIG. 2** muestra un gráfico que demuestra el cambio medio porcentual de peso (desde el día 0) en ratones DIO que recibieron la administración diaria de GLP1-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:72), GLP1-GSA-GDF15(I89R) (SEQ ID NO:73, la mutación I89R suprime la actividad de GDF15), GLP1(9-39)-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:74, suprime la actividad de GLP1), o GSA-GDF15 (SEQ ID NO:75). El tratamiento con dulaglutida sirvió como control positivo, mientras que el tratamiento con vehículo sirvió como control negativo. $\pm$ SEM, n=8.

La **FIG. 3** muestra un esquema de una proteína de fusión GLP1-GDF15.

La **FIG. 4** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de las SEQ ID NO:45, 49, 50, 33, 46 y 44 sobre la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6. Los datos se presentan como porcentaje de cambio en la ingesta de alimentos en comparación con el tratamiento previo a las 24 horas.

La **FIG. 5** muestra un gráfico que muestra la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO:45, 49, 50, 33, 46 y 44) a las 24 horas después de la administración en ratones, según se determina mediante análisis de captura por inmunofluorescencia-digestión con tripsina-LC-MS/MS.

La **FIG. 6** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de las SEQ ID NO:45, 50, 46 y 44 sobre la ingesta de alimentos en ratones deficientes en GFRAL. Los datos se presentan como cambio porcentual en la ingesta de alimentos (en comparación con el tratamiento con vehículo) frente a la concentración plasmática del artículo de prueba con brazos de GLP1 intactos a las 24 horas.

La **FIG. 7** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de la SEQ ID NO:45 sobre la ingesta de alimentos en ratones deficientes en GFRAL. Los datos se presentan como cambio porcentual en la ingesta de alimentos (en comparación con el tratamiento con vehículo) frente a la concentración plasmática del artículo de prueba con brazos de GLP1 intactos a las 24 horas.

La **FIG. 8** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de la SEQ ID NO:33 sobre la ingesta de alimentos en ratones deficientes en GFRAL. Los datos se presentan como cambio porcentual

en la ingesta de alimentos (en comparación con el tratamiento con vehículo) frente a la concentración plasmática del artículo de prueba con brazos de GLP1 intactos a las 24 horas.

La **FIG. 9** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de las SEQ ID NO:50, 46 y 44 sobre la tolerancia a la glucosa en ratones. Los datos se presentan como cambio porcentual en la AUC delta en comparación con el tratamiento con vehículo frente a la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con péptidos GLP1 intactos o variantes de péptidos GLP1.

La **FIG. 10** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de las SEQ ID NO:45 y 49 sobre la tolerancia a la glucosa en ratones. Los datos se presentan como cambio porcentual en la AUC delta en comparación con el tratamiento con vehículo frente a la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con péptidos GLP1 intactos o variantes de péptidos GLP1.

La **FIG. 11** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de la SEQ ID NO:33 sobre la tolerancia a la glucosa en ratones. Los datos se presentan como cambio porcentual en la AUC delta en comparación con el tratamiento con vehículo frente a la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con péptidos GLP1 intactos o variantes de péptidos GLP1.

La **FIG. 12** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de la SEQ ID NO:45 y la SEQ ID NO:36 sobre la tolerancia a la glucosa en ratones. Los datos se presentan como cambio porcentual en la AUC delta en comparación con el tratamiento con vehículo frente a la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con péptidos GLP1 intactos o variantes de péptidos GLP1.

La **FIG. 13** muestra un gráfico que demuestra los efectos de la administración subcutánea de las SEQ ID NO:45 y 44 sobre la secreción de insulina durante una infusión graduada de glucosa en monos cynomolgus. Los datos se presentan como veces de cambio en la AUC de ISR normalizado a la AUC de glucosa (en comparación con el valor de referencia) frente a la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con péptidos GLP1 intactos o variantes de péptidos GLP1.

La **FIG. 14** muestra un gráfico que demuestra la eficacia de la pérdida de peso de la administración subcutánea diaria de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO:45 y 44) en ratones obesos inducidos por dieta. Los datos se presentan como cambio porcentual en el peso corporal desde el Día 0.

La **FIG. 15** muestra un gráfico que demuestra la concentración plasmática de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO:45 y 44) después de 7 días de administración diaria en ratones obesos inducidos por dieta, según se determina mediante análisis de captura por inmovilización de anticuerpos con tripsina-LC-MS/MS.

La **FIG. 16** muestra un gráfico que demuestra el cambio porcentual de 3 días en la ingesta de alimentos al inicio del estudio y después de cada administración subcutánea QW de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO: 44 y 83) durante 4 semanas en primates no humanos espontáneamente obesos. Los datos se presentan para sujetos individuales y aquellos sin nivel detectable del artículo de prueba en su plasma no se incluyen en la figura, como se indica debajo del eje x.

La **FIG. 17** muestra un gráfico que demuestra la concentración plasmática del artículo de prueba total durante un tratamiento de 4 semanas con concentraciones variables de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO: 44 y 83) administradas QW en primates no humanos espontáneamente obesos, según se determina mediante inmunoensayo. Los datos se presentan como la media ($\pm$ SEM).

La **FIG. 18** muestra un gráfico que demuestra la concentración plasmática de la fracción GLP1 que contiene el artículo de prueba durante un tratamiento de 4 semanas con concentraciones variables de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO. 44) administrada QW en primates no humanos espontáneamente obesos, según se determina mediante inmunoensayo. Los datos se presentan como la media ($\pm$ SEM).

La **FIG. 19** muestra un gráfico que demuestra la ingesta diaria absoluta de alimentos antes, durante y después de un tratamiento de 21 días con concentraciones crecientes de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO: 44, 83 y 84) administradas Q3D en primates no humanos espontáneamente obesos. Los datos se presentan como la media ($\pm$ SEM) de diez sujetos por grupo.

La **FIG. 20** muestra un gráfico que ilustra el cambio de peso corporal (con respecto al valor de referencia) después de un tratamiento de 21 días con concentraciones crecientes de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO: 44, 83 y 84) administradas Q3D en primates no humanos espontáneamente obesos. Los datos se presentan como la media ($\pm$ SEM) de diez sujetos por grupo.

La **FIG. 21** muestra un gráfico que demuestra la concentración plasmática del artículo de prueba total durante y después de un tratamiento de 21 días con concentraciones crecientes de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ

ID NO: 44, 83 y 84) administradas Q3D en primates no humanos espontáneamente obesos según se determina mediante inmunoensayo. Los datos se presentan para sujetos individuales.

La FIG. 22 muestra un gráfico que demuestra la concentración plasmática del artículo de prueba que contiene la fracción de GLP1 durante y después de un tratamiento de 21 días con concentraciones crecientes de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (SEQ ID NO: 44 y 84) administradas Q3D en primates no humanos espontáneamente obesos, según se determina mediante inmunoensayo. Los datos se presentan para sujetos individuales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En los antecedentes y a lo largo de la memoria descriptiva se citan o describen varias publicaciones, artículos y patentes. El análisis de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva tiene el propósito de proporcionar un contexto para la invención. Dicho análisis no constituye una admisión de que alguna o todas estas materias formen parte del estado de la técnica con respecto a cualquier invención divulgada o reivindicada.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Por lo demás, ciertos términos usados en la presente tienen el significado que se expone en la memoria descriptiva.

Debe tenerse en cuenta que, como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, cualquier valor numérico, como una concentración o un intervalo de concentración descrito en la presente, debe entenderse modificado en todos los casos por el término "aproximadamente". Así, un valor numérico incluye típicamente un $\pm 10\%$ del valor enumerado. Por ejemplo, una concentración de 1 mg/ml incluye de 0,9 mg/ml a 1,1 mg/ml. De igual manera, un intervalo de concentración del 1% al 10% (p/v) incluye del 0,9% (p/v) al 11% (p/v). Como se usa en la presente, el uso de un intervalo numérico incluye expresamente todos los subintervalos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de dicho intervalo, incluyendo los números enteros dentro de dichos intervalos y las fracciones de los valores, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, el término "por lo menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse referido a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando simplemente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente.

Como se usan en la presente, se entenderá que los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "tiene", "que tiene", "contiene" o "que contiene", o cualquier otra variación de los mismos, implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros, y se pretende que sean no exclusivos o abiertos. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente sólo a esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se cumple con cualquiera de las siguientes: A es verdadera (o está presente) y B es falsa (o no está presente), A es falsa (o no está presente) y B es verdadera (o está presente), y tanto A como B son verdaderas (o están presentes).

Como se usa en la presente, el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos enumerados se entiende que abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y del segundo elementos juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones está comprendida en el significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en la presente. La aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones también se entiende incluida en el significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o".

También debe entenderse que los términos "alrededor de", "aproximadamente", "generalmente", "sustancialmente" y términos similares, usados en la presente cuando se refieren a una dimensión o característica de un componente de la invención preferida, indican que la dimensión/característica descrita no es un límite o parámetro estricto y no excluye variaciones menores de la misma que sean funcionalmente iguales o similares, como entenderán los expertos en la técnica. Como mínimo, dichas referencias que incluyen un parámetro numérico incluirían variaciones que, usando principios matemáticos e industriales aceptados en la técnica (por ejemplo, errores de redondeo, medición u otros errores sistemáticos, tolerancias de fabricación, etc.), no variarían el dígito menos significativo.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos

nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, péptido GLP1, péptidos conectores, proteínas de albúmina sérica, proteínas GDF15 y polinucleótidos que codifican los péptidos), se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual usando métodos conocidos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

La alineación óptima de secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1995) (Ausubel)).

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo consiste en identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificado palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen algún umbral de puntuación de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina umbral de puntuación de la palabra colindante (Altschul et al, supra). Estos resultados iniciales de palabras colindantes actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. A continuación, las correspondencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que ofrece una indicación de la probabilidad de que se produzca por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la suma de probabilidades más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de manera cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones estrictas.

Como se usa en la presente, "sujeto" significa cualquier animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano. El término "mamífero", como se usa en la presente, abarca cualquier mamífero. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos, humanos, etc., más preferiblemente un humano.

El término "administrar" con respecto a los métodos divulgados en al presente, significa un método para prevenir, tratar o mejorar terapéutica o profilácticamente un síndrome, trastorno o enfermedad como se describe en la presente usando un conjugado o compuesto de la invención o una forma, composición o medicamento del mismo. Tales métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de dicho conjugado, compuesto, una forma, composición o medicamento del mismo en diferentes momentos durante el curso de una terapia o concurrentemente en una forma combinada. Debe entenderse que los métodos divulgados en la presente abarcan todos los regímenes de tratamiento terapéutico conocidos. Debe interpretarse que las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia de esta descripción son referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la

presente invención para su uso en esos métodos.

El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de conjugado activo, compuesto o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano, que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro practicante clínico, lo que incluye prevenir, tratar o mejorar un síndrome, trastorno o enfermedad que se está tratando, o los síntomas de un síndrome, trastorno o enfermedad que se está tratando.

Como se usa en la presente, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprenda los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, material bacteriano, material vírico o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un polipéptido aislado se refiere a uno que puede administrarse a un sujeto como un polipéptido aislado; en otras palabras, el polipéptido no puede considerarse simplemente "aislado" si está adherido a una columna o incrustado en un gel. Además, un "fragmento aislado de ácido nucleico" o un "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o de proteína que no se encuentra de manera natural como fragmento y/o no se encuentra típicamente en estado funcional.

Como se usa en la presente, el término "polinucleótido", denominado sinónimamente "molécula de ácido nucleico", "nucleótidos" o "ácidos nucleicos", se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN de cadena sencilla y de cadena doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble, ARN de cadena sencilla y de cadena doble, y ARN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones de triple cadena que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras principales modificadas por estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales como la inosina. Pueden realizarse una variedad de modificaciones en el ADN y el ARN; por lo tanto, el término "polinucleótido" abarca las formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente que se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células. El término "polinucleótido" también abarca las cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, a menudo denominadas oligonucleótidos.

El término "expresión", como se usa en la presente, se refiere a la biosíntesis de un producto génico. El término abarca la transcripción de un gen en ARN. El término también abarca la traducción del ARN en uno o más polipéptidos, y abarca además todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que se producen de manera natural. El polipéptido expresado puede estar dentro del citoplasma de una célula huésped, en el medio extracelular como el medio de crecimiento de un cultivo celular o anclado a la membrana celular.

Como se usan en la presente, los términos "péptido", "polipéptido" o "proteína" pueden referirse a una molécula compuesta de aminoácidos y que los expertos en la técnica pueden reconocer como una proteína. En la presente, para los residuos de aminoácidos se usa el código convencional de una o tres letras. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo los que comprenden péptidos/polipéptidos enlazados (por ejemplo, fusionados) (por ejemplo, proteínas de fusión). El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con un componente de marcado. En la definición también se incluyen, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Las secuencias peptídicas descritas en la presente se escriben de acuerdo con la convención habitual, mediante la cual la región N-terminal del péptido está a la izquierda y la región C-terminal a la derecha. Aunque se conocen las formas isoméricas de los aminoácidos, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente lo contrario.

Proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-Factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15)

Aunque tanto la señalización de GDF15 como la de GLP1 pueden reducir la ingesta de alimentos, estos

efectos parecen ser independientes entre sí. Por ejemplo, los efectos de GDF15 se mantienen en ausencia de GLP1R en ratones y, a la inversa, el tratamiento con GLP1 sigue produciendo efectos en la ingesta de alimentos en ausencia de GFRAL (Hsu et al., *Nature* 550:255-9 (2017), Mullican et al., *Nat Med* 23:1150-7 (2017)). Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que dirigirse a ambos mecanismos simultáneamente podría llevar a mayores reducciones de la ingesta de alimentos y pérdida de peso que cualquiera de los mecanismos por sí solo. La combinación de la farmacología independiente pero complementaria de los agonistas de GDF15 y GLP1 a través de la fusión con la albúmina sérica humana proporcionará beneficios en la pérdida de peso, la sensibilidad a la insulina, la secreción de insulina y los resultados cardiovasculares con una única molécula totalmente recombinante adecuada para la administración una vez a la semana. Uno de los principales desafíos de este enfoque consistirá en administrar cada agonista dentro de la molécula de manera equilibrada, de manera que se acople al receptor correspondiente al nivel deseado, lo suficiente para lograr todos los efectos deseados, pero evitando los efectos adversos sobre la diana. Este equilibrio puede afinarse ajustando la potencia y/o las propiedades farmacocinéticas de cualquiera de los brazos agonistas de la molécula.

En un aspecto general, la invención se refiere a proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 comprenden, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un GLP1 o un péptido variante de GLP1, un primer péptido conector (por ejemplo, un conector amino (N)-terminal), una proteína albúmina sérica, un segundo péptido conector (por ejemplo, un conector carboxi (C)-terminal), y una GDF15 o una proteína variante de GDF15.

Péptido 1 similar al glucagón (GLP1) o péptido variante del GLP1

El péptido 1 similar al glucagón (GLP1) es un secretagogo de insulina sintetizado en el intestino y liberado en respuesta a la ingesta de alimentos. Se secreta principalmente en dos formas, GLP1-(7-37) y GLP1-(7-36)NH₂, que se unen ambas a un receptor de GLP1 específico (GLP1R) que se encuentra en muchos tejidos, incluyendo la célula beta pancreática, donde aumenta la secreción de insulina estimulada por la glucosa, y en el tronco encefálico, donde controla la saciedad y el tamaño de las comidas.

Se conocen numerosos análogos y derivados del GLP1, que pueden denominarse en la presente "variantes de GLP1". Estos péptidos variantes de GLP1 pueden incluir las Exendinas, que son péptidos que se encuentran en el veneno del monstruo de Gila. Estas Exendinas tienen homología de secuencia con el GLP1 nativo y pueden unirse al receptor de GLP1 e iniciar la respuesta de la cascada de transducción de señales.

Se ha demostrado que los péptidos GLP1 y las variantes de GLP1 actúan de varias maneras, que pueden incluir, pero no se limitan a, la disminución de la ingesta de alimentos, la estimulación de la liberación de insulina, la disminución de la secreción de glucagón, la inhibición del vaciado gástrico y la mejora de la utilización de la glucosa.

El GLP1R pertenece a la familia B de receptores heterotriméricos acoplados a proteína G que abarcan 7-transmembrana y se expresa en una amplia variedad de tejidos incluyendo, pero no limitados a, las células α , β y δ de los islotes pancreáticos, el corazón, el riñón, el estómago, el intestino, las neuronas ganglionares nodosas del nervio vago y varias regiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo el hipotálamo y el tronco encefálico. El GLP1R puede acoplarse a G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} , y G_{α_o} (Montrose-Rafizadeh et al., *Endocrinology* 140:1132-40 (1999); Hallbrink et al., *Biochim Biophys Acta* 1546:79-86 (2001)) lo que lleva a aumentos del calcio intracelular, la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, así como la activación de las vías de transducción de señales PKA, PKC, PI-3K, Epac2 y MAPK (Drucker et al., *PNAS* 84:3434-8 (1987); Wheeler et al., *Endocrinology* 133:57-62 (1993); y Holz et al., *JBC* 270:17749-57 (1995)).

En la presente se divulgan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un primer componente, en donde el primer componente es un péptido GLP1 o una variante de GLP1. Como se usa en la presente, los términos "péptido GLP1", "péptido variante de GLP1", "variante de péptido GLP1" y "péptido GLP1 o variante de GLP1" se usan indistintamente. El péptido GLP1 o variante de GLP1 puede comprender una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 1. El péptido de GLP1 o variante de GLP1 puede tener por lo menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una de las secuencias de la Tabla 1. La secuencia del péptido de GLP1 o variante de GLP1 puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) rendimiento y pureza de expresión, (ii) estabilidad in vitro, (iii) potencia in vitro, (iv) retención de la potencia in vitro en combinación con la proteína GDF15 o variante de GDF15, (v) ausencia de xilosilación en serina o potencial de xilosilación en serina, y (vi) propiedades de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo, potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o variante de GLP1 y la proteína GDF15 o variante de GDF15 son capaces de tener actividad agonista sobre el receptor de GLP1R y GDF15R (GFRAL), respectivamente).

Los péptidos GLP1 o variantes de GLP1 que constituyen el primer componente del péptido de fusión de GLP1 se pretende que abarquen péptidos que tienen suficiente homología y funcionalidad con el GLP1 nativo. Los péptidos GLP1 o variantes de GLP1 están diseñados para que sean capaces de unirse al receptor de GLP1 en tejidos que incluyen el páncreas y el tronco encefálico, dando lugar a la misma vía de señalización y mostrando una actividad

fisiológica igual o similar a la que se produce cuando el GLP1 nativo se une al receptor de GLP1 en estos tejidos.

Tabla 1 Péptido 1 similar al glucagón y variantes del mismo

Péptido GLP1 o variante de GLP1	Secuencia del péptido	SEQ ID NO:
{A8S, A30E} GLP1(7-36)	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGR	1
{A8G, G22E, R36G} GLP1 (7-36)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGG	2
Exendina 4 (1-39)	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	3
Exendina 4 (1-28)	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKN	4

Primer péptido conector: Conector amino-terminal (Conector N-terminal)

En la presente se proporcionan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un segundo componente, en donde el segundo componente es un primer péptido conector (es decir, un péptido conector amino-terminal). El primer péptido conector puede comprender una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 2. El primer péptido conector puede comprender por lo menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 2.

El primer péptido conector puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 8 a aproximadamente 48 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 46 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 44 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 14 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 16 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 18 a aproximadamente 38 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 36 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 22 a aproximadamente 34 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 24 a aproximadamente 32 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 26 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, o cualquier valor intermedio. El primer péptido conector puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 residuos de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede contener una repetición de alanina-prolina (es decir, una repetición AP), en donde un dipéptido AP puede denominarse unidad AP. La repetición AP puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27 unidades AP. En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede, por ejemplo, comprender de 2 a 25 unidades AP, de 5 a 25 unidades, de 4 a 23 unidades AP, de 6 a 21 unidades AP, de 8 a 19 unidades AP, de 10 a 17 unidades AP, de 12 a 15 unidades AP, de 5 a 10 unidades AP, de 5 a 15 unidades AP, de 10 a 25 unidades AP, de 15 a 25 unidades AP, de 20 a 25 unidades AP, o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, la repetición AP puede ser interna a un dipéptido de alanina-serina (es decir, una unidad AS) y un dipéptido de glicina-serina (es decir, una unidad GS). La unidad AS puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del primer péptido conector. La unidad GS puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal carboxilo del primer péptido conector.

En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede contener una repetición de glicina-glicina-glicina-glicina-serina (es decir, una repetición G₄S), en la que un pentapéptido G₄S puede denominarse unidad G₄S. La repetición G₄S puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 unidades G₄S. En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede comprender, por ejemplo, de 2 a 15 unidades G₄S, de 4 a 13 unidades G₄S, de 6 a 11 unidades G₄S, de 8 a 9 unidades G₄S, de 2 a 8 unidades G₄S, de 2 a 6 unidades G₄S, de 6 a 8 unidades G₄S, de 7 a 8 unidades G₄S, de 7 a 9 unidades G₄S, de 7 a 10 unidades G₄S, o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, una unidad AS o GS puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del primer péptido conector.

En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede contener una repetición de glicina-glicina-glicina-glicina-alanina (es decir, una repetición G₄A), en donde un pentapéptido G₄A puede denominarse unidad G₄A. La repetición G₄A puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 unidades G₄A. En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede comprender, por ejemplo, de 2 a 15 unidades G₄A, de 4 a 13 unidades G₄A, de 6 a 11 unidades G₄A, de 8 a 9 unidades G₄A, de 2 a 8 unidades G₄A, de 2 a 4 unidades G₄A, de 2 a 6 unidades G₄A, de 4 a 6 unidades G₄A, de 4 a 8 unidades G₄A, de 6 a 8 unidades G₄A, de 6 a 9 unidades G₄A, de 6 a 10 unidades G₄A o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, una unidad de dipéptido de glicina-alanina (es decir, una unidad

GA) puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del primer péptido conector.

En ciertas realizaciones, el primer péptido conector puede ser un péptido de poliglicina. El péptido de poliglicina puede comprender de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 residuos de glicina, de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 residuos de glicina, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 residuos de glicina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 residuos de glicina, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 residuos de glicina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de glicina, o cualquier número intermedio. El primer péptido conector de poliglicina puede comprender 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 residuos de glicina.

La secuencia del primer péptido conector puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) rendimiento y pureza de expresión, (ii) potencia in vitro, (iii) estabilidad in vitro, (iv) ausencia de xilosilación de serina o potencial de xilosilación de serina, y (v) propiedades de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo, potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o la variante de GLP1 y la proteína GDF15 o la variante de GDF15 son capaces de tener actividad agonista sobre GLP1R y GDF15R (GFRAL), respectivamente).

Tabla 2: Primeros péptidos conectores (péptido conector N-terminal)

Primer péptido conector	Secuencia del péptido	SEQ ID NO:
1-1	APAPAPAPAP	5
1-2	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	6
1-3	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	7
1-4	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	8
1-5	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP	9
1-6	ASAPAPAPAPAPAPAPAPAPGS	10
1-7	ASAPAPAPAPAPGS	11
1-8	ASGGGSGGGGS	12
1-9	ASGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	13
1-10	GAGGGGAGGGGA	14
1-11	GAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	15
1-12	GGGGAGGGGAGGGGA	16
1-13	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	17
1-14	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	18
1-15	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	19
1-16	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	20
1-17	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	21
1-18	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	22
1-19	GGGSGGGSGGGGS	23
1-20	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	24
1-21	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	25

Proteína albúmina sérica

En la presente se proporcionan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un tercer componente, en donde el tercer componente es una proteína albúmina sérica (por ejemplo, una proteína albúmina sérica humana (HSA) o una proteína albúmina sérica de gorila (GSA)). La proteína albúmina sérica humana nativa contiene 35 residuos de cisteína (Cys, C) que forman 17 enlaces disulfuro, siendo el residuo Cys-34 la única cisteína libre en la molécula. Se ha demostrado que esta Cys-34 libre funciona como un captador de radicales libres, atrapando múltiples especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Taverna et al., Ann. Intensive Care 3:4 (2013)). Esta Cys libre se mutó a serina (Ser) para minimizar el riesgo de heterogeneidad debida a la oxidación.

La proteína albúmina sérica puede comprender una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 3. La proteína albúmina sérica puede tener por lo menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una de las secuencias de la Tabla 3. La secuencia de la proteína albúmina sérica puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) estabilidad in vitro, (ii) potencia in vitro, y (iii) propiedades de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo y potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o variante de GLP1 y la proteína GDF15 o variante de GDF15 son capaces de tener actividad agonista sobre GLP1R y GDF15R, respectivamente)).

Tabla 3: Proteína albúmina sérica

Proteína de extensión de vida media	Secuencia de proteína	SEQ ID NO:
HSA (C34S)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCV ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDD NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG KCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFS ALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL KAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL	26
GSA (C34S)	DAHKSEVAHRFKDLGEETFKALVLVAF AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCV ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDD NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAARYKA AFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCLAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV FLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL LVEEPQNLIKQNCLEFQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCF SALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALAE LVKHKPKATKEQ LKTVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL	27

Segundo péptido conector: conector carboxi-terminal (conector C-terminal)

En la presente se proporcionan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un cuarto componente, en donde el cuarto componente es un segundo péptido conector (es decir, un péptido conector carboxi-terminal). El segundo péptido conector puede comprender una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 4. El segundo péptido conector puede comprender por lo menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 4.

El segundo péptido conector puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 8 a aproximadamente 48 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 46 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 12 a aproximadamente 44 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 14 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 16 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 18 a aproximadamente 38 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 36 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 42 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 22 a aproximadamente 34 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 24 a aproximadamente 32 residuos de aminoácidos, de aproximadamente 26 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, o cualquier valor intermedio. El segundo péptido conector puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 residuos de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede contener una repetición de alanina-prolina (es decir, una repetición AP), en donde un dipéptido AP puede denominarse unidad AP. La repetición AP puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 unidades AP. En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede comprender, por ejemplo, de 2 a 25 unidades AP, de 5 a 25 unidades, de 4 a 23 unidades AP, de 6 a 21 unidades AP, de 8 a 19 unidades AP, de 10 a 17 unidades AP, de 12 a 15 unidades AP, de 5 a 10 unidades, de 5 a 15 unidades, de 10 a 25 unidades, de 15 a 25 unidades, de 20 a 25 unidades, o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, la repetición AP puede ser interna a un dipéptido de alanina-serina (es decir, una unidad AS) y un dipéptido de glicina-serina (es decir, una unidad GS). La unidad AS puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del segundo péptido conector. La unidad GS puede, por

ejemplo, estar en el extremo terminal carboxilo del segundo péptido conector.

En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede contener una repetición de glicina-glicina-glicina-glicina-serina (es decir, una repetición G₄S), en donde un pentapéptido G₄S puede denominarse una unidad G₄S. La repetición G₄S puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 unidades G₄S. En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede comprender, por ejemplo, de 2 a 15 unidades G₄S, de 4 a 13 unidades G₄S, de 6 a 11 unidades G₄S, de 8 a 9 unidades G₄S, de 2 a 8 unidades G₄S, de 2 a 6 unidades G₄S, de 6 a 8 unidades G₄S, de 7 a 8 unidades G₄S, de 7 a 9 unidades G₄S, de 7 a 10 unidades G₄S, o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, una unidad AS o GS puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del segundo péptido conector.

En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede contener una repetición de glicina-glicina-glicina-glicina-alanina (es decir, una repetición G₄A), en donde un pentapéptido G₄A puede denominarse unidad G₄A. La repetición G₄A puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 unidades G₄A. En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede comprender, por ejemplo, de 2 a 15 unidades G₄A, de 4 a 13 unidades G₄A, de 6 a 11 unidades G₄A, de 8 a 9 unidades G₄A, de 2 a 8 unidades G₄A, de 2 a 4 unidades G₄A, de 2 a 6 unidades G₄A, de 4 a 6 unidades G₄A, de 4 a 8 unidades G₄A, de 6 a 8 unidades G₄A, de 6 a 9 unidades G₄A, de 6 a 10 unidades G₄A, o cualquier valor intermedio. En ciertas realizaciones, una unidad de dipéptido de glicina-alanina (es decir, una unidad GA) puede, por ejemplo, estar en el extremo terminal amino del segundo péptido conector.

En ciertas realizaciones, el segundo péptido conector puede ser un péptido de poliglicina. El péptido de poliglicina puede comprender de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 residuos de glicina, de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 residuos de glicina, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 residuos de glicina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 residuos de glicina, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 residuos de glicina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de glicina, o cualquier número intermedio. El segundo péptido conector de poliglicina puede comprender 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 residuos de glicina.

La secuencia del segundo péptido conector puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) rendimiento y pureza de expresión, (ii) potencia in vitro, (iii) estabilidad in vitro, (iv) ausencia de xilosilación de serina o potencial de xilosilación de serina, y (v) propiedades de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo, potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o la variante de GLP1 y la proteína GDF15 o la variante de GDF15 son capaces de tener actividad agonista de GLP1R y GDF15R (GFRAL), respectivamente)).

Tabla 4: Segundo péptido conector (péptido conector C-terminal)

Segundo péptido conector	Secuencia de péptido	SEQ ID NO:
2-1	APAPAPAPAPAPAPAPAP	28
2-2	GAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	29
2-3	GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	30

Proteína GDF15 o variante de GDF15

El factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15) es una proteína que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). La GDF15 es una proteína secretada que circula como un dímero de 25 kDa. La GDF15 también se denomina factor derivado de la próstata (PDF), citoquina inhibidora de macrófagos-1 (MIC-1), gen activado por NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) (NAG-1) y TGF-beta placentario (PTGF β).

La función del GDF15 aún no se ha dilucidado por completo, pero se ha implicado en múltiples procesos biológicos que incluyen, entre otros, la homeostasis energética, la regulación del peso corporal y la caquexia impulsada por el cáncer y las enfermedades crónicas. Se ha demostrado en ratones, ratas y monos el potencial del GDF15 administrado farmacológicamente para disminuir la ingesta de energía y, por tanto, provocar la pérdida de peso. (Johnen et al., Nat Med 13:1333-40 (2007), Hsu et al., Nature 550:255-9 (2017), Mullican et al., Nat Med 23:1150-7 (2017), Tsai et al., Int J Obesity 42:561-71 (2018)). La pérdida de peso mediada por el tratamiento con GDF15 conlleva mejoras metabólicas que incluyen una mejora de la homeostasis de la glucosa y menos triglicéridos y colesterol plasmáticos (Xiong et al., Sci Trans Med 9:412 (2017)).

GDF15 se une al receptor alfa similar de la familia GDNF (GFRAL), un receptor transmembrana localizado exclusivamente en neuronas en el tronco encefálico (Mullican et al., Hsu et al., Yang et al., Emmerson et al.). Tras la unión de GDF15, GFRAL forma un complejo con RET, una tirosina quinasa que estimula una cascada de fosforilación intracelular en sentido descendente que incluye la modificación postraduccional de AKT, ERK y PLC γ . Aunque los componentes moleculares y celulares adicionales de esta cascada están aún por dilucidar, el efecto último de la

señalización GDF15/GFRAL es la disminución de la ingesta de alimentos y la pérdida de peso (Mullican y Rangwala, 2018).

En la presente se divulgan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un quinto componente, en donde el quinto componente es una proteína GDF15 o una variante de GDF15. La proteína GDF15 puede comprender la secuencia proporcionada en la Tabla 5, y una proteína variante de GDF15 puede comprender una variante de la secuencia proporcionada en la Tabla 5. La proteína GDF15 o variante de GDF15 puede comprender por lo menos un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 5. La secuencia de proteína GDF15 y/o variante de GDF15 puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) rendimiento y pureza de expresión, (ii) estabilidad in vitro, (iii) potencia in vitro, (iv) retención de la potencia in vitro en combinación con la proteína GLP1 o variante de GLP1, (v) ausencia de xilosilación de serina o potencial de xilosilación de serina, y (vi) propiedades de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo, potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o la variante de GLP1 y la proteína GDF15 o la variante de GDF15 son capaces de tener actividad agonista sobre el receptor de GLP1R y/o GDF15R (GFRAL), respectivamente).

Se pretende que las proteínas GDF15 o variantes de GDF15 que constituyen el quinto componente de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 abarquen proteínas que tienen suficiente homología y funcionalidad para activar el GDF15R nativo (GFRAL). Las proteínas GDF15 o variantes de GDF15 están diseñadas para que sean capaces de unirse al GFRAL en el tronco encefálico, lo que da como resultado la misma vía de señalización y presenta el mismo impacto en la ingesta de alimentos que cuando la GDF15 nativa se une al GFRAL en estas neuronas.

Tabla 5: Proteína GDF15 o variante de GDF15

Proteína GDF15 o variante de GDF15	Secuencia de proteína	SEQ ID NO:
GDF15 variante 1	DHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYD DLLAKDCHCI	31
GDF15 WT madura	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACP SQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ TYDDLAKDCHCI	32

Proteínas de fusión GLP1-GDF15

En la presente se proporcionan proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden un primer, un segundo, un tercer, un cuarto y un quinto componente como se ha descrito anteriormente. El primer componente es un péptido GLP1 o una variante de GLP1, el segundo componente es un primer péptido conector, el tercer componente es una proteína albúmina sérica, el cuarto componente es un segundo péptido conector, y el quinto componente es una proteína GDF15 o una variante de GDF15. Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 pueden comprender una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 6. La proteína de fusión GLP1-GDF15 puede comprender por lo menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 6. La proteína de fusión GLP1-GDF15 puede elegirse basándose en por lo menos uno de los siguientes criterios: (i) rendimiento y pureza de expresión, (ii) potencia in vitro, (iii) estabilidad in vitro, (iv) ausencia de xilosilación de serina, y (v) propiedades físicas de la proteína de fusión GLP1-GDF15 (por ejemplo, estabilidad in vivo, potencia in vivo (es decir, si el péptido GLP1 o la variante de GLP1 y la proteína GDF15 o la variante GDF15 son capaces de tener actividad agonista sobre el GLP1R y el GDF15R, respectivamente)), y (vi) equilibrio deseado de la farmacología de agonismo dual in vivo.

Para un agente terapéutico de una proteína de fusión terapéutica que suministre una farmacología doble en una sola molécula, es importante ajustar adecuadamente las propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) de cada fracción para que ambos agonistas se encuentren en el intervalo terapéutico con la dosificación prevista. La investigación exhaustiva de varias proteínas de fusión del péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15) que comprenden varias combinaciones de una secuencia de péptido GLP1 o de una variante de GLP1, una secuencia de primer péptido conector, una secuencia de proteína albúmina sérica, una secuencia de segundo péptido conector y una secuencia de proteína GDF15 o de una variante de GDF15 dio como resultado el descubrimiento de moléculas novedosas que poseen la propiedad única de administrar dosis equilibradas óptimas tanto de los agonistas de GLP1 como de GDF15. Se demostró que estas nuevas proteínas de fusión GLP1-GDF15 son tan eficaces para acoplarse al GDF15R (GFRAL) in vivo como a HSA-GDF15, cuando se usan en un intervalo de dosis específico (véase el Ejemplo 11). Además, las proteínas de fusión GLP1-GDF15, usadas en el mismo intervalo de dosis (véase el Ejemplo 11), resultaron inesperadamente tan eficaces para acoplarse a GLP1R como la dulaglutida (GLP1-Fc), y sin efectos secundarios adversos, a pesar de tener una exposición de la fracción GLP1 10-30 veces mayor que la de la dulaglutida. La administración de péptidos GLP1 como fusiones con HSA-GDF15 alteró inesperadamente la potencia in vivo de la fracción GLP1, pero permitió que las nuevas proteínas de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)-factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15) tuvieran un

equilibrio óptimo de ambos agonistas.

Tabla 6: Proteínas de fusión GLP1-GDF15

Proteínas de fusión GLP1-GDF15	Secuencia de proteína	SEQ ID NO:
1	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADE SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAE FAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG EYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADI CTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFA EEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLE DLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPA SYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	33

2	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHR FKDLGEENFKALVLIFAQYLQOSPFDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLH TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVM CTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLP KLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLA KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP LPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	34
3	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQOSPFD EDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFY YAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKF GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALE VDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVM DDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP DHCP LPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	35
4	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQOSPFDHVKL VNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWA VARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL LYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAK RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP LPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	36
5	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP APDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQOSPFDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHP DYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQEL GEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCP LPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	37

6	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA GGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVK LVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPE RNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDV FLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCK HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPL GPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLOTYDDLLAKDCHCI	38
7	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA QYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCCAKQEPE RNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE I ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAP APAPAPAPDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLOTYDDLLAKDCH CI	39
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVT EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPE RNECFLQ HKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWA VARSQRFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPLGPGRC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD TPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLOTYDDLLAKDCHCI	40

9	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADE SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAE FAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFA EEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLE DLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPA SYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	41
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGGGGAGGGGAGG GGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQ QSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD CCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRH PYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASL QKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRAD LAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCK NYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG KVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCF SALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA VMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAP PAPDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANM HAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	42
11	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGGGGAGGGGAGG GGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTE FAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLO HKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVA RLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIK QNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	43
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPADAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSL HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPR LVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLL PKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLRLA KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAS QAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL SPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	44

13	HGEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIAWL VKGGAPAPAPAPAPAPAPAPDAHKSEV AHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVD VMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACL LPKLDLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEV ENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCV LHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER QIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA ASQAALGLAPAPAPAPAPAPAPAPAPADHCP LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQ KTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	45
14	HGEGTFTS DLSKQMEEEAVRLFIEWLKN GGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPDAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSL HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACL PKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRL AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQNA LLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL HEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ IKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA SQAALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADHCP LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS LHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	46
15	HGEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIAWL VKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADE SAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNL PRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY APELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACL PKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE FAEVSKLV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFA EEGKKLVAASQAALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA GGGGADHCP LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	47
16	HGEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIAWL VKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPE VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LV TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRL RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEK ERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAD HCP LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI KTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI	48

17	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPE VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDLDEGRDEGKASSAKQRLKQKQFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLL RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEK ERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAD HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI KTSLSHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	49
18	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADE SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQA ADKAACLLPKLDLDEGRDEGKASSAKQRLKQKQFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE FAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFA EEGKKLVAASQAALGLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA GGGGADHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLSHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	50
19	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGG GAGGGGAGGGGAGGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDH VKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDLDEGRDEGKASSAKQRLKQKQFGER AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK DVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDF AAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLSHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTG VSLQTYDDLLAKDCHCI	51

20	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGAGGGGAGGGGADAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAC LLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKL VTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQGEYKFQ ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS LHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	52
21	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA GGGGADAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDD NPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRF PAEFAEVSCLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR HPDYSVVLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAED YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTF HADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE TCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCH CI	53
22	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADE SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRL VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQA ADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAE FAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFQGEY EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSV VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFA EEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM HAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	54

23	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEADYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPGPGRCRRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	55
24	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEADYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPGPGRCRRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	56
25	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKEVTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEADYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPGPGRCRRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	57

55

60

65

29	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAPAPAPAPAGSDAHK SEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRP EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKA ACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEK ERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	61
30	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHV KL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP ERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPE LLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCC KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDE TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LOTYDDLLAKDCHCI	62
31	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLVKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRF KDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPK LDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDL TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAS QAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI	63

32	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSDAH KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAE NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLV RPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAAD KAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEY KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEE GKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	64
33	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGD KLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KV HTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAA LGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	65
34	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAGSDAHKSEVAHRFKD LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KV VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAA LGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	66
35	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSDAHKSE VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCD KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAC LLPKLDELDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKL VTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRL LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLV AASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCP LGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTS LHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	67

36	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASAPAPAPAPGSDAHKS EVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPE VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLL RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEK ERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKL VAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	68
37	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL VKGGASGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDL GEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFG DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAF HDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAA LGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGR CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK PDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	69
38	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL VKGGASAPAPAPAPAPGSDAHKSEVAHRFKD LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKL ELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYE TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTP VSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAA LGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGR CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK PDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	70
39	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWL VKGRGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRF KDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPK LDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDE MPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQ NALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAAS QAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI	71

40	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRF KDLGEETFKALVLVAFAYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCLAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK KQTALAELVKHKPKATKEQLKTVMDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAAS QAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI	72
41	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRF KDLGEETFKALVLVAFAYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPK LDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCLAEVEND EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKT YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK KQTALAELVKHKPKATKEQLKTVMDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAAS QAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTPAPCCVPASYNPMVLRQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI	73
42	EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKD LGEETFKALVLVAFAYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCLAEVENDE MPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLRLAKTY ETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV YTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK QTALAELVKHKPKATKEQLKTVMDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQ AALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI	74

Polinucleótidos y vectores de fusión GLP1-GDF15

En otro aspecto general, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica las proteínas de fusión GLP1-GDF15 de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia de codificación de una proteína puede cambiarse (por ejemplo, sustituirse, suprimirse, insertarse, etc.) sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Por consiguiente, los expertos en la técnica entenderán que las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la invención pueden alterarse sin cambiar las secuencias de aminoácidos de las proteínas.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión de la invención. Puede usarse cualquier vector conocido por los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación, como un plásmido, un cósmido, un vector fago o un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión recombinante tal como un plásmido. El vector puede incluir cualquier elemento para establecer una función convencional de un vector de expresión, por ejemplo, un promotor, un elemento de unión a ribosomas, un terminador, un potenciador, un marcador de selección y un origen de replicación. El promotor puede ser constitutivo, inducible o reprimible. En la técnica se conocen varios vectores de expresión capaces de administrar ácidos nucleicos a una célula y que pueden usarse en la presente para la producción de una proteína de

fusión en la célula. Para generar un vector de expresión recombinante de acuerdo con las realizaciones de la invención pueden usarse técnicas de clonación convencionales o síntesis de genes artificiales.

En otro aspecto general, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión de la invención. A la vista de la presente divulgación para la expresión recombinante de proteínas de fusión de la invención puede usarse cualquier célula huésped conocida por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las células huésped son células TG1 o BL21 de *E. coli*, células CHO-DG44 o CHO-K1 o células HEK293. De acuerdo con algunas realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante se transforma en las células huésped mediante métodos convencionales, como transfección química, choque térmico o electroporación, donde se integra estable en el genoma de la célula huésped de tal manera que el ácido nucleico recombinante se expresa de manera eficaz.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un método de producción de una proteína de fusión de la invención, que comprende cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión en condiciones para producir una proteína de fusión de la invención, y recuperar la proteína de fusión de la célula o cultivo celular (por ejemplo, del sobrenadante). Las proteínas de fusión expresadas pueden recogerse de las células y purificarse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica y como se describe en la presente.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto general, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "composición farmacéutica", como se usa en la presente, significa un producto que comprende proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención y las composiciones que los comprenden también son útiles en la fabricación de un medicamento para las aplicaciones terapéuticas mencionadas en la presente.

Como se usa en la presente, el término "portador" se refiere a cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizador, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contenga lípidos, microesfera, encapsulación liposomal u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. Como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de una composición de acuerdo con la invención o la actividad biológica de una composición de acuerdo con la invención. De acuerdo con realizaciones particulares, en vista de la presente divulgación, en la invención puede usarse cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado para su uso en una composición farmacéutica peptídica.

Las sales ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención incluyen, y no se limitan a acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, glioceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato y trietioduro. Los ácidos orgánicos o inorgánicos también incluyen, entre otros, el ácido hidrídico, perclórico, sulfúrico, fosfórico, propiónico, glicólico, metanosulfónico, hidroxietanosulfónico, oxálico, 2-naftalenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, sacarínico o trifluoroacético.

Las sales básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, aluminio, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (también conocido como tris(hidroximetil)aminometano, trometano o "TRIS"), amoníaco, benzatina, t-butilamina, calcio, cloroprocaína, colina, ciclohexilamina, dietanolamina, etilendiamina, litio, L-lisina, magnesio, meglumina, N-metil-D-glucamina, piperidina, potasio, procaína, quinina, sodio, trietanolamina o zinc.

En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. La formulación farmacéutica puede tener un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 10, por ejemplo de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 9. La formulación puede comprender además por lo menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en un sistema tampón, conservantes, agentes de tonicidad, agentes quelantes, estabilizantes y surfactantes.

En la técnica se conoce la formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo, 21ª

edición (2005) y ediciones posteriores). Ejemplos no limitativos de ingredientes adicionales incluyen: tampones, diluyentes, solventes, agentes reguladores de la tonicidad, conservantes, estabilizadores y agentes quelantes. En la formulación de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica es una formulación líquida. Un ejemplo preferido de una formulación líquida es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. La formulación líquida puede comprender una solución, una suspensión, una emulsión, una microemulsión, un gel y similares. Una formulación acuosa comprende típicamente por lo menos un 50% p/p de agua, o por lo menos un 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o por lo menos un 95% p/p de agua.

En una realización, la composición farmacéutica puede formularse como un inyectable que puede inyectarse, por ejemplo, a través de un dispositivo de inyección (por ejemplo, una jeringuilla o una bomba de infusión). La inyección puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo.

En otra realización, la composición farmacéutica es una formulación sólida, por ejemplo, una composición liofilizada o secada por pulverización, que puede usarse tal cual, o a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes de su uso. Las formas de dosificación sólidas pueden incluir comprimidos, como comprimidos comprimidos y/o comprimidos recubiertos, y cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina dura o blanda). La composición farmacéutica también puede presentarse en forma de bolsitas, grageas, polvos, gránulos, pastillas para chupar o polvos para reconstituir, por ejemplo.

Las formas de dosificación pueden ser de liberación inmediata, en cuyo caso pueden comprender un portador soluble en agua o dispersable, o pueden ser de liberación retardada, liberación sostenida o liberación modificada, en cuyo caso pueden comprender polímeros insolubles en agua que regulan la velocidad de disolución de la forma de dosificación en el tracto gastrointestinal.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intranasal, intrabucal o sublingual.

El pH de una formulación acuosa puede estar comprendido entre pH 3 y pH 10. En una realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En otra realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un tampón. Ejemplos no limitativos de tampones incluyen: arginina, ácido aspártico, bicina, citrato, hidrogenofosfato disódico, ácido fumárico, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, ácido maleico, ácido málico, acetato sódico, carbonato sódico, dihidrógeno fosfato sódico, fosfato sódico, succinato, ácido tartárico, tricina y tris(hidroximetil)-aminometano, y mezclas de los mismos. El tampón puede estar presente individualmente o en el agregado, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos tampones específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un conservante. Ejemplos no limitativos de conservantes incluyen: cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencilico, bronopol, 4-hidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, clorocresol, clorohexidina, clorfenesina, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 4-hidroxibenzoato de etilo, imidurea, 4-hidroxibenzoato de metilo, fenol, 2-fenoxietanol, 2-feniletanol, 4-hidroxibenzoato de propilo, deshidroacetato de sodio, tiomerosal y sus mezclas. El conservante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos conservantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente isotónico. Ejemplos no limitativos de la realización incluyen una sal (como cloruro sódico), un aminoácido (como glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano y treonina), un aldito (como glicerol, 1,2-propanediol propilenglicol), 1,3-propanediol y 1,3-butanediol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y mezclas de los mismos. Otro ejemplo de agente isotónico es un azúcar. Ejemplos no limitativos de azúcares pueden ser mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pullulano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta-HPCD, almidón soluble, hidroxietilalmidón, y carboximetilcelulosa sódica. Otro ejemplo de agente isotónico es un alcohol de azúcar, en donde el término "alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C(4-8) que tiene por lo menos un grupo -OH. Ejemplos no limitativos de alcoholes de azúcar incluyen manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada agente isotónico enumerado en este párrafo constituyen realizaciones alternativas de la invención. El agente isotónico puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1

mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente quelante. Ejemplos no limitativos de agentes quelantes incluyen ácido cítrico, ácido aspártico, sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes quelantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizador. Ejemplos no limitativos de estabilizadores incluyen uno o más inhibidores de la agregación, uno o más inhibidores de la oxidación, uno o más surfactantes y/o uno o más inhibidores de la proteasa.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizante, en donde dicho estabilizante es carboxi-/hidroxicelulosa y derivados de la misma (como HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, 2-metiltoetanol, polietilenglicol (como PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, sales (como cloruro sódico), sustancias que contienen azufre (como monotioglicerol) o ácido tioglicólico. El estabilizante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos estabilizantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En realizaciones adicionales de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más surfactantes, preferiblemente un surfactante, por lo menos un surfactante, o dos surfactantes diferentes. El término "surfactante" se refiere a cualquier molécula o ion que se compone de una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El surfactante puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes no iónicos y/o surfactantes zwitteriónicos. El surfactante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos surfactantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más inhibidores de la proteasa, como, por ejemplo, EDTA, y/o ácido clorhídrico (HCl) de benzamidina. El inhibidor de proteasa puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos inhibidores específicos de proteasa constituyen realizaciones alternativas de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender una cantidad de una base de aminoácidos suficiente para disminuir la formación de agregados del polipéptido durante el almacenamiento de la composición. El término "base de aminoácido" se refiere a uno o más aminoácidos (como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), o análogos de los mismos. Cualquier aminoácido puede estar presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Puede estar presente cualquier estereoisómero (es decir, L, D o una mezcla de los mismos) del aminoácido base. La base de aminoácido puede estar presente individualmente o en combinación con otras bases de aminoácido, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada una de estas bases de aminoácidos específicas constituyen realizaciones alternativas de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención incluyen las sales convencionales no tóxicas o las sales de amonio cuaternario que se forman a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de tales sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, citrato, canforato, dodecilsulfato, clorhidrato, bromhidrato, lactato, maleato, metanosulfonato, nitrato, oxalato, pivalato, propionato, succinato, sulfato y tartrato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos como las sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos como las sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas como las sales de dicitohexilamino y sales con aminoácidos como la arginina. Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con, por ejemplo, haluros de alquilo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier medio que logre su propósito pretendido. Los ejemplos incluyen la administración por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal u ocular. La administración puede ser por vía oral. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los conjugados activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales, soluciones ácidas, soluciones alcalinas, soluciones de dextrosa-agua, soluciones isotónicas de carbohidratos y complejos de inclusión de ciclodextrina solubles en agua.

La presente invención también abarca un método para elaborar una composición farmacéutica que comprende mezclar un portador farmacéuticamente aceptable con cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención. Además, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas elaboradas mezclando uno o más portadores farmacéuticamente aceptables con cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención.

Además, las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención pueden tener una o más formas cristalinas polimorfas o amorfas y, como tales, se pretende que estén incluidas en el alcance de la invención. Además, las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 pueden formar solvatos, por ejemplo con agua (es decir, hidratos) o solventes orgánicos comunes. Como se usa en la presente, el término "solvato" significa una asociación física de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención con una o más moléculas de solvente. Esta asociación física implica varios grados de enlace iónico y covalente, incluyendo el enlace de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de solvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. Se pretende que el término "solvato" abarque tanto los solvatos en fase de solución como los aislables. Ejemplos no limitativos de solvatos adecuados incluyen etanolatos, metanolatos y similares.

Se pretende que la presente invención incluya dentro de su alcance polimorfos y solvatos de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención. Así, en los métodos de tratamiento de la presente invención, el término "administrar" abarcará los medios para tratar, mejorar o prevenir un síndrome, trastorno o enfermedad descritos en la presente con las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o los polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención o un polimorfo o solvato de los mismos, que obviamente estarán incluidos dentro del alcance de la invención aunque no se divulgen específicamente.

En otra realización, la invención se refiere a las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la invención para su uso como medicamento.

La presente invención incluye dentro de su alcance profármacos de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de esta invención. En general, tales profármacos serán derivados funcionales de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, que son fácilmente convertibles in vivo en las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 requeridos. Así, en los métodos de tratamiento de la presente invención, el término "administrar" abarcará el tratamiento de los diversos trastornos descritos con las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 específicamente divulgados o con unas proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 que pueden no estar específicamente divulgados, pero que se convierten en las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 especificados in vivo después de su administración al paciente. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Durante cualquiera de los procesos de preparación de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15 de la presente invención, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto puede lograrse por medio de grupos protectores convencionales, como los descritos en Protective Groups in Organic Chemistry, ed. J. F. W. McOrg. J. F. W. McOmie, Plenum Press, 1973; y T. W. Greene & P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente usando métodos conocidos en la técnica.

Métodos de uso

La presente invención está dirigida a una proteína de fusión GLP1-GDF15, polinucleótido de fusión GLP1-GDF15, y/o composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar o mejorar un síndrome mediado por el receptor de GDF15 (GDF15R, GFRAL) y/o un síndrome, trastorno o enfermedad mediado por el receptor de GLP1 en un sujeto con necesidad de ello.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición o mejorar un trastorno, enfermedad o afección o uno cualquiera o más síntomas de dicho trastorno, enfermedad o afección en un sujeto con necesidad de ello.

De acuerdo con realizaciones particulares, la enfermedad, trastorno o afección se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes de tipo I o II, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debida a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía

diabética y otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión y los factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal, eczema, apnea del sueño, osteoartritis, síndrome de ovario poliquístico, síndrome renal crónico, depresión y/o cáncer.

De acuerdo con realizaciones particulares, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de terapia que es suficiente para lograr uno, dos, tres, cuatro o más de los efectos siguientes: (i) reducir o aliviar la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (ii) reducir la duración de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (iii) prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (iv) provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o de un síntoma asociado a la misma; (v) prevenir el desarrollo o aparición de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o de un síntoma asociado a la misma; (vi) prevenir la recurrencia de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o de un síntoma asociado a la misma; (vii) reducir la hospitalización de un sujeto que tenga la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (viii) reducir la duración de la hospitalización de un sujeto que tenga la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (ix) aumentar la supervivencia de un sujeto con la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma; (xi) inhibir o reducir la enfermedad, el trastorno o la afección a tratar, o un síntoma asociado a la misma en un sujeto; (xii) potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia; y/o (xiii) mejorar la calidad de vida de un sujeto con la enfermedad, el trastorno o la afección a tratar.

La cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con varios factores, como la enfermedad, el trastorno o la afección a tratar, el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del sujeto (incluyendo, por ejemplo, la edad, el peso corporal, la salud), si el sujeto es un humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones del tratamiento se valoran óptimamente para optimizar la seguridad y la eficacia.

Como se usan en la presente, se pretende que los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieran a una mejora o inversión de por lo menos un parámetro físico medible relacionado con la enfermedad, trastorno o afección, que no es necesariamente perceptible en el sujeto, pero que puede ser perceptible en el sujeto. Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" también pueden referirse a provocar la regresión, prevenir la progresión o, por lo menos, ralentizar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección. En una realización particular, "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a un alivio, prevención del desarrollo o aparición, o reducción de la duración de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección. En una realización particular, "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a la prevención de la recurrencia de la enfermedad, trastorno o afección. En una realización particular, "tratar", "que trata", y "tratamiento" se refieren a un aumento de la supervivencia de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección. En una realización particular, "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a la eliminación de la enfermedad, trastorno o afección en el sujeto.

En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición o mejorar la obesidad, o uno cualquiera o más síntomas de obesidad en un sujeto con necesidad de ello. En algunas realizaciones, el peso corporal de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente un 0,01% y aproximadamente 0,1%, entre aproximadamente un 0,1% y aproximadamente un 0,5%, entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%, entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 3%, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 10%, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 15%, entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 20%, entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 25%, entre aproximadamente un 25% y aproximadamente un 30%, entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 35%, entre aproximadamente un 35% y aproximadamente un 40%, entre aproximadamente un 40% y aproximadamente un 45%, o entre aproximadamente un 45% y aproximadamente un 50%, con respecto al peso corporal de un sujeto antes de la administración de cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones farmacéuticas, formas o medicamentos de la invención descritos en la presente, o en comparación con sujetos de control que no reciben ninguna de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente.

En algunas realizaciones, la reducción del peso corporal se mantiene durante aproximadamente 1 semana, durante aproximadamente 2 semanas, durante aproximadamente 3 semanas, durante aproximadamente 1 mes, durante aproximadamente 2 meses, durante aproximadamente 3 meses, durante aproximadamente 4 meses, durante aproximadamente 5 meses, durante aproximadamente 6 meses, durante aproximadamente 7 meses, durante aproximadamente 8 meses, durante aproximadamente 9 meses, durante aproximadamente 10 meses, durante aproximadamente 11 meses, durante aproximadamente 1 año, durante aproximadamente 1,5 años, durante aproximadamente 2 años, durante aproximadamente 2,5 años, durante aproximadamente 3 años, durante aproximadamente 3,5 años, durante aproximadamente 4 años, durante aproximadamente 4,5 años, durante aproximadamente 5 años, durante aproximadamente 6 años, durante aproximadamente 7 años, durante aproximadamente 8 años, durante aproximadamente 9 años, durante aproximadamente 10 años, durante

aproximadamente 15 años o durante aproximadamente 20 años, por ejemplo.

La presente invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención, tratamiento, retraso de la aparición o mejora de un síndrome, trastorno o enfermedad, o de uno cualquiera o más síntomas de dicho síndrome, trastorno o enfermedad en un sujeto con necesidad de ello, en donde dicho síndrome, trastorno o enfermedad se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, tolerancia alterada a la glucosa (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debida a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema.

Como se usa en la presente, el síndrome metabólico se refiere a un sujeto que tiene uno o más de los siguientes: niveles altos de azúcar en sangre (por ejemplo, niveles altos de azúcar en sangre en ayunas), presión arterial alta, niveles anormales de colesterol (por ejemplo, niveles bajos de HDL), niveles anormales de triglicéridos (por ejemplo, niveles altos de triglicéridos), una cintura grande (es decir, circunferencia de la cintura), aumento de grasa en la zona abdominal, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, niveles elevados de proteína C reactiva (es decir, un estado proinflamatorio) y niveles plasmáticos de inhibidor-1 del activador del plasminógeno y fibrinógeno aumentados (es decir, un estado protrombótico).

La presente invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para reducir la ingesta de alimentos en un sujeto con necesidad de ello. En algunas realizaciones, la ingesta de alimentos de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente un 0,01% y aproximadamente un 0,1%, entre aproximadamente un 0,1% y aproximadamente un 0,5%, entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%, entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 3%, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 10%, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 15%, entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 20%, entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 25%, entre aproximadamente un 25% y aproximadamente un 30%, entre aproximadamente un 30% y aproximadamente un 35%, entre aproximadamente un 35% y aproximadamente un 40%, entre aproximadamente un 40% y aproximadamente un 45%, o entre aproximadamente un 45% y aproximadamente un 50%, con respecto a la ingesta de alimentos de un sujeto antes de la administración de cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente, o en comparación con sujetos de control que no reciben ninguna de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente.

En algunas realizaciones, la reducción de la ingesta de alimentos se mantiene durante aproximadamente 1 semana, durante aproximadamente 2 semanas, durante aproximadamente 3 semanas, durante aproximadamente 1 mes, durante aproximadamente 2 meses, durante aproximadamente 3 meses, durante aproximadamente 4 meses, durante aproximadamente 5 meses, durante aproximadamente 6 meses, durante aproximadamente 7 meses, durante aproximadamente 8 meses, durante aproximadamente 9 meses, durante aproximadamente 10 meses, durante aproximadamente 11 meses, durante aproximadamente 1 año, durante aproximadamente 1,5 años, durante aproximadamente 2 años, durante aproximadamente 2,5 años, durante aproximadamente 3 años, durante aproximadamente 3,5 años, durante aproximadamente 4 años, durante aproximadamente 4,5 años, durante aproximadamente 5 años, durante aproximadamente 6 años, durante aproximadamente 7 años, durante aproximadamente 8 años, durante aproximadamente 9 años, durante aproximadamente 10 años, durante aproximadamente 15 años o durante aproximadamente 20 años, por ejemplo.

La presente invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para reducir la hemoglobina glicosilada (A1C) en un sujeto con necesidad de ello. En algunas realizaciones, la A1C de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente un 0,001% y aproximadamente un 0,01%, entre aproximadamente un 0,01% y aproximadamente un 0,1%, entre aproximadamente un 0,1% y aproximadamente un 0,2%, entre aproximadamente un 0,2% y aproximadamente un 0,3%, entre aproximadamente un 0,3% y aproximadamente un 0,4%, entre aproximadamente un 0,4% y aproximadamente un 0,5%, entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 1,5%, entre aproximadamente un 1,5% y aproximadamente un 2%, entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 2,5%, entre aproximadamente un 2,5% y aproximadamente un 3%, entre aproximadamente un 3% y aproximadamente un 4%, entre aproximadamente un 4% y aproximadamente un 5%, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 6%, entre aproximadamente un 6% y aproximadamente un 7%, entre aproximadamente un 7% y aproximadamente un 8%, entre aproximadamente un 8% y aproximadamente un 9%, o entre aproximadamente un 9% y aproximadamente un 10% con respecto a la A1C de un sujeto antes de la administración de cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente, o en comparación

con sujetos de control que no reciben ninguna de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en métodos para reducir los niveles de glucosa en sangre en ayunas en un sujeto con necesidad de ello. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas pueden reducirse a menos de aproximadamente 140 a aproximadamente 150 mg/dl, menos de aproximadamente 140 a aproximadamente 130 mg/dl, menos de aproximadamente 130 a aproximadamente 120 mg/dl, menos de aproximadamente 120 a aproximadamente 110 mg/dl, menos de aproximadamente 110 a aproximadamente 100 mg/dl, menos de aproximadamente 100 a aproximadamente 90 mg/dl, o menos de aproximadamente 90 a aproximadamente 80 mg/dl, con respecto a los niveles de glucosa en sangre en ayunas de un sujeto antes de la administración de cualquiera de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente, o en comparación con sujetos de control que no reciben ninguna de las proteínas de fusión GLP1-GDF15, polinucleótidos de fusión GLP1-GDF15, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descritos en la presente.

La presente invención proporciona una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para modular la actividad del receptor de GLP1 y la actividad del receptor de GDF15 en un sujeto con necesidad de ello. Como se usa en la presente, "modular" se refiere a aumentar o disminuir la actividad del receptor.

En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención o una forma, composición o medicamento de la misma se administra a un sujeto con necesidad de ello una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, seis veces al día, siete veces al día u ocho veces al día. En otras realizaciones, una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención o una forma, composición o medicamento de la misma se administra a un sujeto con necesidad de ellos una vez cada dos días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, dos veces al mes, tres veces al mes, o cuatro veces al mes.

Otra realización de la invención comprende una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición o mejorar una enfermedad, trastorno o síndrome, o uno o más síntomas de cualquiera de dichas enfermedades, trastornos o síndromes en un sujeto con necesidad de ello. En ciertas realizaciones, la terapia de combinación es un segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones, la terapia combinada es una terapia quirúrgica.

Como se usa en la presente, el término "en combinación", en el contexto de la administración de dos o más terapias a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia.

Como se usa en la presente, la terapia combinada se refiere a la administración a un sujeto con necesidad de ello de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o una o más terapias quirúrgicas, concurrentemente con una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención o una forma, composición o medicamento de los mismos. En algunas realizaciones, los uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias quirúrgicas pueden administrarse el mismo día que una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención, y en otras realizaciones, los uno o más agentes terapéuticos o terapias quirúrgicas adicionales pueden administrarse en la misma semana o el mismo mes que una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención.

La presente invención también contempla una proteína de fusión GLP1-GDF15, polinucleótido de fusión GLP1-GDF15, y/o composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición de, o mejorar cualquiera de las enfermedades, trastornos, síndromes, o síntomas descritos en la presente en un sujeto con necesidad de ello con una terapia combinada en donde la proteína de fusión GLP1-GDF15, el polinucleótido de fusión GLP1-GDF15, y/o la composición farmacéutica están en combinación con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (por ejemplo, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina, etc.); un agonista del receptor de GLP1 (por ejemplo, agonistas de los receptores de GLP1 de acción corta, como exenatida y lixisenatida; agonistas de los receptores de GLP1 de acción intermedia, como liraglutida; agonistas de los receptores de GLP1 de acción prolongada, como exenatida de liberación prolongada, albiglutida, dulaglutida); un inhibidor del cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT-2) (por ejemplo, canaglifozina, dapaglifozina, empaglifozina, etc.); secuestradores de ácidos biliares (por ejemplo, colesevelam, etc.); agonistas de los receptores de dopamina (por ejemplo, bromocriptina de liberación rápida); biguanidas (por ejemplo, metformina, etc.); insulina; oxintomodulina; sulfonilureas (por ejemplo, clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, glibenclamida, glibornurida, glisoxepida, gliciclopíramida, tolazamida, tolbutamida, acetohexamida, carbutamida, etc.); y tiazolidinedionas (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona, ciglitazona, darglitazona, englitazona, netoglitazona, rivoglitazona,

troglitazona, etc.). En algunas realizaciones, la dosis del agente o agentes terapéuticos adicionales se reduce cuando se administra en combinación con una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención. En algunas realizaciones, cuando se usa en combinación con una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención, el agente o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse en dosis más bajas que cuando se usa cada uno individualmente.

La presente invención contempla una proteína de fusión GLP1-GDF15, un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 y/o una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición o mejorar cualquiera de las enfermedades, trastornos, síndromes o síntomas descritos en la presente en un sujeto con necesidad de ello en combinación con una terapia quirúrgica. En ciertas realizaciones, la terapia quirúrgica puede ser cirugía bariátrica (por ejemplo, cirugía de bypass gástrico, como la cirugía de bypass gástrico en Y de Roux; gastrectomía en manga; cirugía de banda gástrica ajustable; derivación biliopancreática con cruce duodenal; balón intragástrico; plicatura gástrica; y combinaciones de las mismas).

En las realizaciones en las que los uno o más agentes terapéuticos o terapias quirúrgicas adicionales se administran el mismo día que una cantidad eficaz de una proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o un polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención, la proteína de fusión GLP1-GDF15 y/o el polinucleótido de fusión GLP1-GDF15 de la invención pueden administrarse antes, después o simultáneamente con el agente adicional o la terapia quirúrgica terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se administran las terapias a un sujeto. Por ejemplo, una primera terapia (por ejemplo, una composición descrita en la presente) puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un sujeto.

REALIZACIONES

La invención proporciona también las siguientes realizaciones.

La realización 1 es una proteína de fusión de péptido 1 similar al glucagón (GLP1)/factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15), en donde la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende desde el extremo N terminal al extremo C terminal un péptido GLP1, un primer péptido conector, una proteína albúmina sérica, un segundo péptido conector y una proteína GDF15.

La realización 2 es la proteína de fusión GLP1-GDF15 de la realización 1, en donde el péptido GLP1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1-4.

La realización 3 es la proteína de fusión GLP1-GDF15 de la realización 1 o 2, en donde el primer péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5-25.

La realización 4 es la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde la proteína albúmina sérica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:26 o la SEQ ID NO:27.

La realización 5 es la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-4, en donde el segundo péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:28-30.

La realización 6 es la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-5, en donde la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32.

La realización 7 es una proteína de fusión GLP1-GDF15, en donde la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:33-74 y 84,, preferiblemente, la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44.

La realización 8 es un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-7.

La realización 9 es un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la realización 8.

La realización 10 es una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado de la realización 8 o el vector de la realización 9.

La realización 11 es una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La realización 12 es una composición farmacéutica de la realización 11 para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto con necesidad de ello, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debida a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema.

La realización 13 es una composición farmacéutica de la realización 11 para su uso en un método para reducir la ingesta de alimentos en un sujeto con necesidad de ello.

La realización 14 es una composición farmacéutica de la realización 11 para su uso en un método para modular la actividad del receptor de GLP1, o de GDF15 (GFRAL) en un sujeto con necesidad de ello.

La realización 15 es un kit que comprende la proteína de fusión GLP1-GDF15 de cualquiera de las realizaciones 1-7, el ácido nucleico aislado de la realización 8, y/o el vector de la realización 9.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Combinación de agonistas de GLP1 y GDF15

En ratones obesos inducidos por dieta (DIO) se probaron los posibles efectos aditivos sobre la pérdida de peso de la combinación de agonistas de GLP1 y GDF15. La liraglutida, un agonista del GLP1, se administró sola o en combinación con una molécula de HSA-GDF15 (SEQ ID NO:81) durante 8 días. La liraglutida se administró diariamente por vía subcutánea, mientras que el HSA-GDF15 se administró cada dos días. La pérdida de peso corporal fue mayor en los animales que recibieron ambos agonistas en comparación con cualquiera de los agentes individualmente, lo que demuestra el potencial de aditividad cuando se combinan estos mecanismos independientes (FIG. 1).

Ejemplo 2: Diseño de las proteínas de fusión GLP1-GDF15

Las proteínas de fusión recombinantes compuestas por un péptido GLP1 o un péptido variante de GLP1, una proteína albúmina sérica y una proteína GDF15 o una proteína variante de GDF15 se diseñaron de la siguiente manera: el péptido GLP1 o los péptidos variantes de GLP1 se conectaron mediante un primer péptido conector en el extremo C-terminal del péptido GLP1 o del péptido variante de GLP1 al extremo N-terminal de la albúmina sérica humana. La albúmina sérica humana se conecta en el extremo C-terminal al extremo N-terminal de la proteína GDF15 o de la variante de proteína GDF15 mediante un segundo péptido conector. El objetivo del diseño es no alterar la interfaz de dimerización de GDF15 y permitir la formación del disulfuro nativo entre cadenas, dando como resultado un homodímero de aproximadamente 170 KDa. Las moléculas completas se diseñaron para elaborarse de forma recombinante, necesitando sólo un gen (FIG. 3).

Los péptidos GLP1 o péptidos variantes de GLP1 incluyen el péptido GLP1(7-36) humano con mutaciones o el péptido Exendina 4(9-39), un péptido del veneno del monstruo de Gila que agoniza el receptor de GLP1 humano. La SEQ ID NO:1 contiene mutaciones (A8S, A30E) (la numeración de las posiciones de las mutaciones se refiere a las mutaciones del péptido GLP1 de la Tabla 1, no a las del inicio de la proteína de fusión) y la SEQ ID NO:2 contiene mutaciones (A8G, G22E, R36G) del péptido GLP1 humano (UniProtKB-P01275 98-127). LA SEQ ID NO:3 contiene el péptido Exendina 4 (UniProtKB-P26349 48-86).

La albúmina sérica humana nativa (UniProtKB-P02768 25-609) contiene 35 residuos de cisteína (Cys, C) que forman 17 enlaces disulfuro intramoleculares, dejando la Cys-34 como la única cisteína libre. Se ha demostrado que esta Cys-34 libre funciona como un captador de radicales libres, atrapando múltiples especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Taverna et. al, Ann Intensive Care, 3:4 (2013)). Por lo tanto, esta Cys libre se mutó a Ser para crear la SEQ ID NO:26 con el fin de minimizar la reactividad química y el riesgo de heterogeneidad debido a la oxidación.

El extremo N-terminal de la GDF15 madura (UniProtKB-Q99988 197-308) contiene un sitio de susceptibilidad proteolítica (R198) y un sitio de susceptibilidad de desamidación (N199). Por lo tanto, las proteínas de fusión contienen GDF15(201-308) (SEQ ID NO:31) con esos sitios de susceptibilidad eliminados.

Ejemplo 3: Métodos de expresión y purificación

as proteínas de fusión GLP1-GDF15, las proteínas GLP1-primer conector-albúmina sérica (por ejemplo, HSA, GSA), las proteínas albúmina sérica (por ejemplo, HSA, GSA)-segundo conector-GDF15, y/o las proteínas GDF15 utilizadas en los ejemplos anteriores se expresaron en HEK Expi293F™ (ThermoFisher Scientific, N° de Cat. A14527) o ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific, N° de Cat. A29127; Waltham, MA). Para la expresión en HEK Expi293F™, se transfectó en las células un plásmido que codificaba la proteína de fusión GLP1-GDF15 mediante transfección transitoria siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células Expi293F se mantuvieron en suspensión en medio de expresión Expi293™ (ThermoFisher Scientific) en una incubadora con agitación ajustada a 37° C., 8% de CO₂ y 125 RPM. Las células se pasaron de tal manera que el día de la transfección pudieran diluirse hasta 2,5 x 10⁶ células por ml, manteniendo la viabilidad celular en un 95% o más. Las transfecciones transitorias se realizaron usando el kit de transfección ExpiFectamine™ 293 (ThermoFisher Scientific). Por cada ml de células diluidas a transfectar, se diluyó un microgramo de ADN plasmídico en medio de formación de complejos OptiMEM™ SFM. Se usó el reactivo ExpiFectamine™ 293 en una proporción 1:2,6 (v/v, ADN:reactivo) y también se diluyó en OptiMEM™ y se dejó que incubase durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN diluido y el reactivo de transfección se combinaron durante veinte minutos, permitiendo la formación del complejo ADN/lípido, y después se añadieron a las células. Después de la incubación durante la noche, se añadieron a las células la alimentación Expi293™ y el potenciador ExpiFectamine™ 293. Las células se cultivaron con agitación a 37°C durante cuatro días antes de recoger los sobrenadantes de cultivo.

Las células ExpiCHO-S™ se mantuvieron en suspensión en medio de expresión ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific) en una incubadora con agitación a 37°C, 8% de CO₂ y 125 RPM. Las células se transfectaron de tal manera que el día de la transfección pudieran diluirse hasta 6,0 x 10⁶ células por ml, manteniendo la viabilidad celular en un 98% o más. Las transfecciones transitorias se realizaron con el kit de transfección ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific). Por cada ml de células diluidas a transfectar, se diluye un microgramo de ADN plasmídico en medio de formación de complejos OptiPRO™ SFM. El reactivo ExpiFectamine™ CHO se usa a una proporción de 1:3 (v/v, ADN:reactivo) y también se diluye en OptiPRO™. El ADN diluido y el reactivo de transfección se combinaron durante un minuto, permitiendo la formación del complejo ADN/lípido, y después se añadieron a las células. Después de la incubación durante la noche, se añadieron a las células el alimento ExpiCHO™ y el potenciador ExpiFectamine™ CHO. Las células se cultivaron con agitación a 32°C durante cinco días antes de recoger los sobrenadantes de cultivo.

Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos recogidos, o mediante captura por afinidad en un solo paso, o mediante un proceso de captura por afinidad de dos pasos, seguido de un paso de pulido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) preparativa. Los sobrenadantes celulares de células ExpiCHO™ transfectadas transitoriamente se cargaron en una columna HSA CaptureSelect preequilibrada (dPBS, pH 7,2) (CaptureSelect Human Albumin Affinity Matrix de ThermoFisher Scientific) con una capacidad aproximada de 10 mg de proteína por ml de resina. Después de la carga, las proteínas no unidas y las impurezas se eliminaron lavando la columna con hasta 12 volúmenes de columna (CV) de dPBS pH 7,2 seguido de 3 CV de NaCl 1M en fosfato sódico 50 mM, pH 7,4. La proteína de fusión GLP1-GDF15 que se unió a la columna se eluyó con hasta 10 CV de acetato sódico 0,1M, pH 3,5, en tubos de fracciones que contenían un 10 por ciento (en volumen) de Tris 1M (sin titulación). Las fracciones de pico se agruparon y filtraron sobre una membrana de 0,2 µm, y luego se intercambiaron con tampón en dPBS pH 7,2 o se continuaron hasta el paso SEC a 4°C.

Para el paso de SEC, la proteína del paso de captura se concentró hasta alcanzar un volumen adecuado antes de cargarla en una columna 26/60 superdex 200 (GE Healthcare; Little Chalfont, Reino Unido). Se agruparon las fracciones de proteínas eluidas de la columna SEC con alta pureza (determinada por SDS-PAGE). La concentración de proteínas (de cualquiera de los dos métodos) se determinó mediante la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro BioTek Synergy HTTM. La calidad de las proteínas purificadas se evaluó mediante SDS-PAGE y HPLC analítica de exclusión por tamaño (SE-HPLC, sistema HPLC Dionex). Los niveles de endotoxinas se midieron usando un ensayo LAL (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod; East Falmouth, MA).

Ejemplo 4: Acoplamiento de dianas dual y efectos aditivos con la administración de los agonistas tanto de GLP1 como de GDF15 en una molécula

La posibilidad de conseguir efectos aditivos mediante la administración de agonistas tanto de GLP1 como de GDF15 en una molécula se comprobó evaluando la pérdida de peso en ratones DIO durante ocho días de tratamiento con fusiones de los agonistas con albúmina sérica de gorila (GSA). En estas moléculas de herramienta la GSA se usó como sustituto de la HSA. Los ratones recibieron la administración subcutánea de 8 nmol/kg de GLP1-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:72), GLP1-GSA-GDF15(I89R) (SEQ ID NO:73, la mutación I89R suprime la actividad de GDF15), GLP1(9-36)-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:74, o GSA-GDF15 (SEQ ID NO:75), estos dos últimos diseñados para representar GLP1 degradado. Dos grupos adicionales de animales sirvieron como controles y referencias, uno que recibió solo vehículo y otro al que se administró el agonista de GLP1 dulaglutida. Los ratones tratados con GLP1-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:72) tuvieron una mayor pérdida de peso que los tratados con GLP1(9-36)-GSA-GDF15 (SEQ ID NO:74), GLP1-GSA-GDF15(I89R) (SEQ ID NO:73) y GSA-GDF15 (SEQ ID NO:75), lo que constituye una prueba de concepto de que tanto el GLP1R como el GFRAL pueden agonizarse con una única molécula, con la consiguiente eficacia aditiva (FIG. 2).

Ejemplo 5: Efecto del péptido GLP1 o variantes del péptido GLP1 y primeros péptidos conectores sobre la potencia in vitro de GLP1R humano y la estabilidad plasmática ex vivo en humanos e in vivo en ratones.

Diferentes péptidos GLP1 o variantes del péptido GLP1 y diferentes primeros péptidos conectores tienen diferentes efectos sobre la potencia in vitro del receptor de hGLP1 en un ensayo que mide los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) en células HEK que sobreexpresan hGLP1. Se cribaron las fusiones para determinar la potencia in vitro del GLP1R en ensayos celulares que medían la producción intracelular de cAMP usando el inmunoensayo competitivo de cAMP Lance (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del kit. En los ensayos se usaron células clonales HEK293 que expresaban de manera estable GLP1R de ratón o humano. Los datos resultantes se usaron para calcular los valores de EC_{50} de los compuestos usando el software estadístico Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). En general, la variante de GLP1 (SEQ ID NO:1) es menos potente que las otras dos variantes de GLP1 (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3) en el ensayo in vitro de hGLP1R.

Se evaluó la estabilidad ex vivo en plasma humano. Brevemente, se generó plasma humano recién preparado, no congelado, a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación. Las proteínas de fusión se incubaron en esta matriz a 37° C con un mezclado suave durante 0, 4, 24, 48, 72 y 96 horas. La estabilidad de la región GLP1 de las moléculas de fusión a lo largo del tiempo en plasma humano se monitorizó mediante captura por inmunofinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS. Los péptidos trípticos seleccionados, concretamente, HSE (HSEGTFTSDVSSYLEGQAAK) (SEQ ID NO:76), HGE-1 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) y HGE-2 (HGEGTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78), se localizan en el extremo N-terminal del péptido GLP1 o de los péptidos variantes de GLP1 (SEQ ID NO:1, 2 y 3), respectivamente. Estos péptidos trípticos seleccionados se monitorizaron mediante LC-MS/MS después de la captura por inmunofinidad anti-GDF15 y la digestión con tripsina, que sirvió como medida sustitutiva de la concentración de molécula de fusión con un extremo N-terminal intacto que contiene GLP1. Con esta metodología, todas las moléculas probadas demostraron una estabilidad razonable del GLP1 a lo largo del tiempo en el plasma humano.

Se evaluó la estabilidad in vivo en ratones. Las proteínas de fusión se administraron por vía subcutánea a ratones C57Bl/6 macho a una dosis de 2 mg/kg en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre en tubos de recogida de sangre K3E Sarstedt con inhibidores de la proteasa a las 0, 4, 24 y 48 horas después de la administración. El plasma se preparó por centrifugación. La estabilidad de la región GLP1 de las proteínas de fusión a lo largo del tiempo in vivo en ratones se monitorizó mediante captura por inmunofinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS. Los péptidos trípticos seleccionados, concretamente, HSE (HSEGTFTSDVSSYLEGQAAK) (SEQ ID NO:76), HGE-1 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) y HGE-2 (HGEGTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78), se localizan en el extremo N-terminal de las proteínas de fusión que contienen las SEQ ID NO:1, 2 y 3, respectivamente. Estos péptidos trípticos seleccionados se monitorizaron mediante LC-MS/MS después de la captura por inmunofinidad anti-GDF15 y la digestión con tripsina, que sirvió como medida sustitutiva de la concentración de proteína de fusión con un extremo N-terminal intacto que contiene GLP1. Con esta metodología, todas las moléculas probadas demostraron una estabilidad razonable del GLP1 a lo largo del tiempo in vivo en ratones.

La Tabla 7 proporciona los resultados de la potencia in vitro del receptor de GLP1 midiendo los niveles de cAMP de las células sobreexpresantes de GLP1R, la estabilidad plasmática humana ex vivo y la estabilidad plasmática de ratón in vivo, ambas evaluadas por espectrometría de masas, para las proteínas de fusión GLP1-GDF15 indicadas.

Tabla 7: Potencia in vitro de hGLP1R, estabilidad plasmática ex vivo en humanos e in vivo en ratones de las proteínas de fusión GLP1-GDF15

Seq ID	GLP1 (SEQ ID NO)	Primer péptido conector (SEQ ID NO)	Potencia de hGLP1R in vitro		Estabilidad plasmática ex vivo en humanos por MS (% de GLP1 intacto con respecto a t=0)					Estabilidad plasmática in vivo en ratones por MS (% de GLP1 intacto con respecto a HSA en la misma molécula)		
			(nM)	+/- error	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h	4 h	24 h	48 h
68	3	1-7 (11)	0.09	0.04	90.8	94	89.5	74.4	70.1	93.4	57.6	31.5
60	3	1-6 (10)	0.09	0.03	No probada					No probada		
59	3	1-9 (13)	0.1	0.05								
64	3	1-19 (23)	0.12	0.03	87.4	80	75.7	62.2	56.9	80.3	51.7	32.9
67	3	1-8 (12)	0.13	0.02	86.5	89.8	76	68.2	64.7	88.8	55	34.1
70	2	1-7 (11)	0.26	0.1	122.7	125.8	122.1	102.	99.5	93.1	71.2	44.8
62	1	1-9 (13)	0.35	0.1	No probada					No probada		
69	2	1-8 (12)	0.38	0.03								
63	2	1-19 (23)	0.39	0.15	92.5	88.7	82.2	77.8	77.3	109	95	74.6
61	1	1-6 (10)	0.39	0.09	No probada					No probada		
66	1	1-7 (11)	0.6	0.14								
71	1	1-19 (23)	1.5	0.13	100.2	93.6	84.9	62.6	60.6	87	52	30
65	1	1-8 (12)	2.98	0.74	100.7	84.9	84.8	69.4	65.4	102	59.3	45.8

Ejemplo 6: Eliminación de la xilosilación ligada a O mediante la eliminación de residuos de serina en el primer y el segundo péptidos conectores

Se analizaron las moléculas que contenían conectores glicina-serina para determinar los niveles de xilosa ligada a O, ya que se informó de que los glicanos de xilosa se unían a los conectores glicina-serina (Spahr et. al, mAbs 6 (4): 904-914). Brevemente, las muestras se prepararon por dilución en Guanidina-HCl tamponada a pH 8.0 para desnaturalización, seguido de la adición de DTT para reducción e incubación durante 1 hora a 37° C. Después de la reducción, las muestras se alquilaban usando yodoacetamida recién preparada durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se añadió DTT a la muestra para quelar la yodoacetamida sin reaccionar. A continuación, las muestras se desalaron usando columnas Zeba Spin Desalting de acuerdo con el protocolo del fabricante en 50 mM Tris, 1 mM de CaCl₂, pH 8,0 y se digirieron con tripsina (Promega) durante 4 h a 37°C. Después de la digestión, se añadió TFA a cada muestra para inactivar la reacción de digestión. Las muestras digeridas se conservaron a 4°C y se inyectaron en LC/MS en el plazo de 24 horas.

Las muestras digeridas se inyectaron en una columna de resolución rápida Agilent AdvanceBio Peptide Map Micro Bore usando una Agilent Infinity 1290 UHPLC (Agilent Technologies) a un caudal de 0,1 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 65°C. Los solventes para HPLC de grado espectrometría de masas (ácido fórmico al 0,1% y B: ACN al 100% en ácido fórmico al 0,1%) se adquirieron a VWR. Los péptidos proteolíticos se eluyeron de la columna usando un gradiente de 50 min del 2 al 40% de ACN en 0,1% de FA. El efuente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Q-Exactive mediante sonda de ionización por electropulverización calentada (HESI) usando un voltaje de pulverización de 3,5 kV, gas de envoltura 20, gas auxiliar 7, tubo de transferencia de iones a 299° C. y vaporizador a 100° C.

Se realizó un experimento dependiente de datos top 2 con el escaneo de precursores configurado para detección Orbitrap, resolución 70.000, intervalo de masas 150-2000 m/z, AGC Target 1.0e6, tiempo máximo de inyección 50 ms, 1 microescaneo, polaridad positiva. Los criterios de decisión de precursores fueron selección monoisotópica de precursores-péptidos, estado de carga: 2-7, exclusión dinámica: 6,0 segundos y umbral de intensidad de precursores de 5e4. Los péptidos precursores fueron aislados por el cuadrupolo con una ventana de

aislamiento de 1,6 m/z y se enviaron a la célula de colisión. Una energía de colisión de 28 dio como resultado la disociación colisional de alta energía (HCD) del péptido. A continuación, estos fragmentos se transfirieron al orbitrap para la medición de masas. Los ajustes del orbitrap eran: resolución 17.500, intervalo 200-2000 m/z, objetivo AGC 5e5, tiempo máximo de inyección 100 ms, 1 microescaneo y espectros adquiridos en modo centroeide.

Los datos de mapeo de péptidos se procesan usando el algoritmo de búsqueda Byonic (Protein Metrics Inc). Se añadió a los parámetros de búsqueda una biblioteca personalizada de glicosaminoglicanos con núcleo de xilosa y su masa monoisotópica como modificación específica de Ser. Los resultados de la búsqueda Byonic se importaron en Byologic (Protein Metrics Inc) para la cuantificación sobre la base de áreas de cromatogramas de iones extraídos (XIC) de las especies de péptidos modificados y no modificados.

[00238] Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 que contenían los primeros y segundos péptidos conectores G₄S mostraron varios niveles de xilosilación ligada a O en los residuos de serina de los primeros y segundos péptidos conectores. La Tabla 8 muestra los resultados de tres moléculas de este tipo expresadas transitoriamente a partir de células ExpiCHO. El nivel de xilosa dependía del contexto de la proteína y oscilaba entre "no detectado" y el 1% en los primeros péptidos conectores, que conectan el péptido GLP1 o las variantes del péptido GLP1 con la proteína HSA, y del 11,61% al 56,2% en los segundos péptidos conectores, que conectan la proteína HSA con la proteína GDF15 o la variante de la proteína GDF15. Para evitar el riesgo potencial de xilosilación ligada a O en los péptidos conectores, se diseñaron y generaron proteínas de fusión GLP1-GDF15 que no contenían residuos de serina en los primeros y/o segundos péptidos conectores. Estas proteínas de fusión GLP1-GDF15 contenían conectores que comprendían repeticiones AP, repeticiones G₄A o repeticiones de poliglicina.

Tabla 8: Niveles de xilosa detectados en residuos de serina en el primer o el segundo péptido conector de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 que comprenden péptidos conectores G₄S.

ID de secuencia	Motivo de conector		% de abundancia relativa de Xyl Total por mapeo de péptidos
64	Primer péptido conector (1-9) que conecta GLP1 a HSA	SEQ ID NO:13 AS-8x(G ₄ S)	No detectado
	Segundo péptido conector (2-3) que conecta HSA a GDF15	SEQ ID NO:30 GS-8x(G ₄ S)	11.61
67	Primer péptido conector (1-8) que conecta GLP1 a HSA	SEQ ID NO:12 AS-2x(G ₄ S)	1.0
	Segundo péptido conector (2-3) que conecta HSA a GDF15	SEQ ID NO:30 GS-8x(G ₄ S)	56.2
63	Primer péptido conector (1-19) que conecta GLP1 a HSA	SEQ ID NO:23 3x(G ₄ S)	0.5
	Segundo péptido conector (2-3) que conecta HSA a GDF15	SEQ ID NO:30 GS-8x(G ₄ S)	23.1

Ejemplo 7: Potencia in vitro sobre GLP1R y GDF15R

Se probó la actividad in vitro de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 para determinar la potencia tanto de GLP1R como de GDF15R en ensayos basados en células. La actividad de GDF15R (GFRAL) se determinó midiendo el nivel de fosfo-AKT (Ser473) en células de neuroblastoma humano SK-N-AS transfectadas de manera estable para que sobreexpresen GFRAL humano o de mono cynomolgus. La fosforilación de AKT después de tratar las células que expresaban GFRAL con varias concentraciones de moléculas de fusión se midió usando el kit Phospho-AKT (Ser473) Assay (Cisbio, Bedford, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos resultantes se usaron para calcular los valores de EC₅₀ del compuesto usando el software estadístico Prism (GraphPad Software San Diego). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 probadas en la Tabla 9 tienen una potencia GDF15R similar, con EC₅₀ en el intervalo de 4,6-6,9 nM.

La potencia de GLP1R de las fusiones se determinó midiendo los niveles de cAMP en células HEK293 clonales transfectadas de manera estable para que sobreexpresasen GLP1R humano, de ratón o de mono cynomolgus. La producción intracelular de cAMP después de tratar las células con concentraciones variables de las moléculas de fusión se midió mediante el inmunoensayo competitivo de cAMP Lance (Perkin Elmer, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del kit. Los datos resultantes se usaron para calcular los valores de EC₅₀ de los

compuestos usando el software estadístico Prism (GraphPad Software San Diego).

Cuando los residuos de serina del primer péptido conector, que conecta el péptido GLP1 o la variante del péptido GLP1 con la proteína HSA, se sustituyeron por alanina o se eliminaron (cambiando de conector G₄S a G₄A o poli-G de longitud similar), la actividad de GLP1 no se vio afectada cuando se probó en un ensayo de GLP1R humano o de ratón. Además, el cambio del segundo péptido conector, que conecta la proteína HSA con la proteína GDF15 o la variante de proteína GDF15, de GS-8x(G₄S) a GA-8x(G₄A) o 10x(AP) no afectó a la potencia de GLP1R. Además, se elaboraron proteínas de fusión con número creciente de repeticiones en el primer conector (5x(G₄A), 8x(G₄A), 5x(AP), 10x(AP), 20x(AP), 25x(AP) y se probaron en el ensayo del GLP1R humano. Los resultados demostraron que estas proteínas de fusión activaban la señalización del GLP1R con distinta potencia.

Tabla 9: potencia in vitro de proteínas de fusión GLP1-GDF15 sobre GLP1R y GDF15R

SEQ ID NO:	Inducción de cAMP								
	hGLP1R			mGLP1R			cGLP1R		
	EC50 (nM)	STD	n	EC50 (nM)	STD	n	EC50 (nM)	STD	n
45	0.070	0.012	2	0.023	0.003	2	0.155	0.125	4
47	0.081	0.038	2	0.029	0.007	2	0.156	0.074	4
48	0.092	0.040	2	0.037	0.006	2	0.163	0.038	4
49	0.127	0.058	2	0.040	0.001	2	0.170	0.031	4
50	0.095	0.050	2	0.029	0.004	2	0.154	0.029	4
33	0.120	0.051	2	0.034	0.000	2	0.190	0.140	4
46	0.065	0.008	2	0.030	0.001	2	0.117	0.003	2
44	0.076	0.037	2	0.032	0.004	2	0.109	0.039	2
GLP1	0.011	0.004	25	0.012	0.004	21	0.013	0.003	8
Dulaglutida	0.038	0.010	27	0.020	0.004	23	0.045	0.014	8
Liraglutida	0.057	0.025	18	0.052	0.022	14	0.079	0.022	2
Albiglutida	0.981	0.438	23	1.486	0.624	19	1.759	0.735	6

SEQ ID NO:	Fósforo-AKT (Ser473)					
	hGDF15R			cGDF15R		
	EC 50 (nM)	CI 95%	n	EC 50 (nM)	CI 95%	n
45	4.561	3.975-5.258	1	1.031	0.6679-1.4	1
47	5.899	5.146-6.813	1	0.937	0.7413-1.137	1
48	6.283	5.479-7.281	1	1.585	1.374-1.819	1
49	4.825	4.11-5.726	1	1.157	0.7357-1.62	1
50	5.983	5.333-6.731	1	1.225	0.9865-1.473	1
33	5.251	4.523-6.113	1	1.004	0.7745-1.243	1
46	6.917	6.3-7.623	1	1.521	1.267-1.805	1
44	4.945	4.393-5.572	1	1.350	1.102-1.614	1

Ejemplo 8: Efecto de los primeros y segundos péptidos conectores sobre la pureza y estabilidad de la proteína

Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SE-HPLC) para examinar la pureza y estabilidad de las moléculas cuantificando el porcentaje de especies principales, así como las especies de alto peso molecular (HMW) que representan agregados y las especies de bajo peso molecular (LMW) que representan

fragmentos. Brevemente, para determinar la pureza de la proteína, se inyectaron 20 µg de proteína en una columna Tosoh TSKgel BioAssist G3SWXL (Nº de Cat. 20026) con una fase móvil de 1xDPBS, pH7,2 (Gibco Nº de Cat. 14190-136). Las especies proteicas se eluyeron a un caudal de 1 ml/min a temperatura ambiente, y los valores de absorbancia UV-280 nm se monitorizaron usando un sistema HPLC Dionex Ultimate3000 equipado con un detector de longitud de onda variable. Para determinar la estabilidad de la proteína, se inyectaron 100 µg de proteína en una columna Tosoh TSKgel BioAssist G3SWXL (Nº de Cat. 20026) con una fase móvil de fosfato sódico 0,2 M y pH 7,0. Las especies de proteína se eluyeron a un caudal de 0,7 ml/min a temperatura ambiente, y los valores de absorbancia UV-280 nm se monitorizaron usando un sistema HPLC Dionex Ultimate3000 equipado con un detector de longitud de onda variable. Los datos se analizaron usando el software Chromeleon.

Cuando se elaboraron las proteínas de fusión GLP1-GDF15 a partir de la expresión transitoria en células ExpiCHO y se purificaron mediante captura por afinidad siguiendo los métodos descritos en el Ejemplo 2, las proteínas de fusión GLP1-GDF15 con segundos péptidos conectores 10x(AP) (SEQ ID NO:28) (que conectan la proteína HSA con la proteína GDF15 o la variante de proteína GDF15) dieron lugar sistemáticamente a un porcentaje inferior de especies de bajo peso molecular (LMW) en comparación con las moléculas que contenían segundos péptidos conectores GA-8x(G₄A) (SEQ ID NO:29) (Tabla 10). Las especies LMW se eliminaron mediante pasos de pulido durante la purificación y las proteínas de fusión GLP1-GDF15 finales resultantes tenían una pureza superior al 97% mediante SE-HPLC.

Se probó la estabilidad de estas proteínas de fusión GLP1-GDF15 en condiciones de estrés definidas. Para forzar el estrés de oxidación inducido por sustancias químicas, las muestras se expusieron a una concentración final de peróxido de hidrógeno al 0,1% y se incubaron durante 6 horas en la oscuridad antes de añadir catalasa para detener la reacción. En la condición de oxidación inducida por metales, se añadió a las muestras una concentración final de 30 µM de hierro ferroso. Después de una incubación durante dos semanas en la oscuridad, se añadió EDTA para detener la reacción. Para probar la estabilidad a pH bajo, las muestras se dializaron en tampón de acetato 50 mM pH 3,5, se mantuvieron 6 horas y se dializaron de nuevo a fosfato sódico 0,1M pH 7,4. Para probar la estabilidad de las muestras bajo estrés térmico, se concentraron a aproximadamente 10 mg/ml usando un filtro ultra centrífugo con un punto de corte de peso molecular de 30 KDa y se mantuvieron a 40° C durante dos semanas en PBS. Estas muestras que se sometieron a la oxidación química o inducida por metales mencionada anteriormente, así como a la condición de pH bajo o a la condición de estrés térmico, se analizaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (columna TOSOH) con un caudal de 1 ml/min para una serie de 20 minutos a temperatura ambiente. Las señales se recogieron para UV-280 nm (sistema LC Agilent 1100) y el análisis de datos se realizó con Chemstation (Agilent).

La Tabla 11 muestra la influencia del segundo conector sobre la estabilidad de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 bajo estrés térmico (40° C durante 2 semanas). Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 que contenían un segundo péptido conector 10x(AP) (SEQ ID NO:28) dieron como resultado un nivel inferior de especies LMW formadas en comparación con las proteínas de fusión GLP1-GDF15 que contenían un segundo péptido conector GA-8x(G₄A) (SEQ ID NO:29), lo que indica que un segundo péptido conector AP es más estable térmicamente en comparación con un segundo péptido conector G₄A. En otras condiciones de estrés probadas (pH bajo, oxidación inducida por metales o productos químicos), el nivel de especies LMW de las muestras permanece en niveles mínimos, similares a los de las muestras no sometidas a estrés.

Se realizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la estabilidad térmica de las proteínas GLP1-HSA-GDF15. Las muestras se evaluaron a aproximadamente 0,5-1 mg/ml en tampón PBS pH7,4 usando un instrumento DSC MicroCal VP-Capilar automatizado. Los escaneos térmicos abarcan de 25° C a 95° C a una velocidad lineal de 1° C./min. Para cada serie se usó un tiempo de preescaneo de 15 minutos y un periodo de filtrado de 10 segundos. Los datos se procesaron usando la función de ajuste no-2 estados del paquete de software Origin7. Los resultados de DSC demostraron que estas proteínas de fusión GLP1-GDF15 tienen una temperatura de fusión (T_m) en el intervalo de 63-72° C. (Tabla 12), similar a una proteína de fusión HSA-GDF15 que no contiene un péptido GLP1 o una variante del péptido GLP1.

Tabla 10: Proteínas de fusión GLP1-GDF15 con diferentes primeros y segundos péptidos conectores muestran varios niveles de especies de bajo peso molecular mediante SE-HPLC después de la purificación por afinidad.

SEQ ID NO:	Primer péptido conector (SEQ ID NO)	Segundo péptido conector (SEQ ID NO)	SE-HPLC después de purificación por afinidad		
			% HME	% principal	% LMW
45	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	0-1.32	98.68-100	0
33	5x(G ₄ A) (18)	10x(AP) (28)	0	100	0
44	5x(AP) (5)	10x(AP) (28)	0	100	0
47	25x(G) (22)	GA-8x(G ₄ A) (29)	2.3	86.64	11.06
48	20x(G) (21)	GA-8x(G ₄ A) (29)	5.56	83.77	10.67
49	4x(G ₄ A) (17)	GA-8x(G ₄ A) (29)	2.93	94.64	2.43
46	5x(AP) (5)	GA-8x(G ₄ A) (29)	0	92.33	7.67
50	5x(G ₄ A) (18)	GA-8x(G ₄ A) (29)	0.77-3	89.71-91.00	7.29-8.22

Tabla 11: Proteínas de fusión GLP1-GDF15 con diferentes primeros y segundos péptidos conectores muestran varios niveles de especies de bajo peso molecular bajo estrés térmico (40° C durante 2 semanas).

SEQ ID NO:	Péptido de GLP1 o variante de péptido de GLP1	Primer péptido conector (SEQ ID NO)	Segundo péptido conector (SEQ ID NO)	SE-HPLC después de todos los pasos de purificación % principal	SE-HPLC después de 40° C durante 2 semana		
					% HME	% principal	% LMW
45	Basado en GLP1	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	98.68-100	5.32	92.6	2.13
33	Basado en GLP1	5x(G ₄ A) (18)	10x(AP) (28)	100	2.5	95.4	2.1
44	Basado en Exendina4	5x(AP) (5)	10x(AP) (28)	100	7.3	90.8	2.6
47	Basado en GLP1	25x(G) (22)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.91	93.9	5.19
48	Basado en GLP1	10x(G) (21)	GA-8x(G ₄ A) (29)	97.13	5.22	86.97	7.81
49	Basado en GLP1	4x(G ₄ A) (17)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.42	93.56	6.02
50	Basado en GLP1	5x(G ₄ A) (18)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	0.49	92.17	7.34
46	Basado en Exendina4	5x(AP) (5)	GA-8x(G ₄ A) (29)	100	5.9	74.5	19.6

Tabla 12: T_m para las proteínas de fusión GLP1-GDF15 mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

SEQ ID NO:	Péptido de GLP1 o variante de péptido de GLP1	Primer péptido conector (SEQ ID NO)	Segundo péptido conector (SEQ ID NO)	Tm1	Tm2	Tm3	Tm4
45	Basado en GLP1	10x(AP) (6)	10x(AP) (28)	64.88	68.79	73.38	76.59
33	Basado en GLP1	5x(G ₄ A) (18)	10x(AP) (28)	63.96	68.38	73.37	76.44
47	Basado en GLP1	25x(G) (22)	GA-8x(G ₄ A) (29)	68.31	74.55	77.98	na
48	Basado en GLP1	20x(G) (21)	GA-8x(G ₄ A) (29)	64.74	69.28	74.27	77.15
49	Basado en GLP1	4x(G ₄ A) (17)	GA-8x(G ₄ A) (29)	64.64	69.58	74.29	77.04
50	Basado en GLP1	5x(G ₄ A) (18)	GA-8x(G ₄ A) (29)	63.39	67.78	72.8	75.99
46	Basado en Exendina4	5x(AP) (5)	GA-8x(G ₄ A) (29)	72.07	74.81	77.02	na
44	Basado en Exendina4	5x(AP) (5)	10x(AP) (29)	69.79	73.82	76.23	na

Ejemplo 9: Estudio en plasma humano ex vivo

La estabilidad de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 se evaluó ex vivo en plasma humano. Brevemente, se generó plasma humano recién preparado, no congelado, a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación. Las proteínas de fusión se incubaron en esta matriz a 37° C con un mezclado suave durante 0, 4, 24, 48, 72 y 96 horas. La concentración de las moléculas de fusión a lo largo del tiempo en plasma humano se monitorizó mediante captura por inmunofinidad con un anticuerpo anti-GDF15 e inmunodetección con un anticuerpo anti-HSA ("formato total") o un anticuerpo específico anti-GLP1 N-terminal ("formato activo de GLP1 "). Las tablas 13 y 14 muestran los resultados de estos dos inmunoensayos.

Tabla 13: Estabilidad en plasma humano ex vivo mediante inmunoensayo medido mediante anticuerpo de captura anti-GDF15 y un anticuerpo de detección anti-HSA.

	Concentración (µg/ml)							% de recuperación normalizado a 0 h						
Punto temporal (h)	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44
0	13.69	13.13	13.14	12.69	13.32	12.79	13.77	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	14.14	13.56	12.83	13.20	12.53	12.89	13.30	103.3	103.3	97.6	104.0	94.0	100.8	96.6
24	13.84	13.49	12.16	13.21	13.31	12.76	12.53	101.1	102.8	92.5	104.0	99.9	99.8	91.0
48	12.84	13.57	12.21	12.56	12.48	11.88	11.55	93.8	103.4	92.9	98.9	93.7	92.9	83.9
72	13.18	14.00	11.21	12.12	12.35	12.18	12.93	96.3	106.7	85.3	95.5	92.7	95.2	93.9
96	12.92	13.01	11.23	12.09	12.16	12.32	12.34	94.4	99.1	85.4	95.2	91.3	96.3	89.6

Tabla 14: estabilidad en plasma humano ex vivo mediante inmunoensayo por un anticuerpo de captura anti-GDF15 y un anticuerpo de detección de GLP1 (que reconoce el GLP1 N-terminal, específico de la forma activa de GLP1).

	Concentración (µg/ml)							% de recuperación normalizado a 0 h						
Punto temporal (h)	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44	SEQ ID: 50	SEQ ID: 33	SEQ ID: 49	SEQ ID: 48	SEQ ID: 47	SEQ ID: 45	SEQ ID: 44
0	11.45	10.93	11.28	11.54	11.50	11.99	12.04	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	11.60	10.86	10.85	11.44	11.00	11.35	10.88	101.3	99.4	96.2	99.1	95.7	94.6	90.4
24	10.32	10.50	10.17	10.43	10.08	10.64	9.73	90.2	96.1	90.2	90.4	87.7	88.7	80.8
48	9.07	9.66	9.47	9.40	8.28	10.26	8.95	79.2	88.4	83.9	81.5	72.0	85.6	74.3
72	8.68	9.22	8.71	8.76	6.30	9.17	9.13	75.8	84.4	77.3	75.9	54.8	76.4	75.9
96	8.37	9.71	7.94	8.24	6.62	9.14	8.21	73.1	88.8	70.4	71.4	57.6	76.2	68.2

Ejemplo 10: Farmacocinética multiespecie**Farmacocinética en ratones**

Se administraron proteínas de fusión GLP1-GDF15 derivadas de las SEQ ID NO: 50, 45, 46 y 44 a ratones C57Bl/6 hembra a una dosis de 5 mg/kg IV y SC en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre, se procesó el plasma y se midieron las concentraciones del fármaco hasta 4 días después de ambas vías de administración. La concentración de analitos en plasma después de la administración IV y SC se midió mediante captura por inmunofinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS. Los péptidos tripticos seleccionados, concretamente, ALV (ALVLI AFAQYLQQSPFEDHVK) (SEQ ID NO:79), HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQA AK) (SEQ ID NO:77), y HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78), y TDT (TDTGVSLQTYDDLAK) (SEQ ID NO:80), que están localizados cerca del extremo N-terminal de la proteína HSA, del extremo N-terminal del péptido GLP1 o de la variante del péptido GLP1, y del extremo C-terminal de la proteína GDF15 o de la variante de la proteína GDF15, respectivamente. La monitorización de estos péptidos sustitutivos permitió la evaluación farmacocinética de cada región (GLP1, HSA,

ES 3 011 982 T3

GDF15) de las proteínas de fusión GLP1-GDF15. Los perfiles de concentración-tiempo del fármaco en plasma se resumen en las Tablas 15-22.

Tabla 15: concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:50 a lo largo del tiempo después de una única administración subcutánea (SC) en ratones C57BL/6 hembra.

SC	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
2	14.780	15.140	16.360	0.905	1.014	1.063
6	26.700	37.300	30.180	1.248	5.012	1.563
24	19.980	36.780	28.880	0.691	2.956	0.944
48	10.716	22.940	19.640	0.330	1.677	0.458
72	5.034	10.790	12.960	0.286	0.525	0.631
96	2.450	7.218	8.444	0.244	0.844	0.699

Tabla 16: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:50 a lo largo del tiempo después de una única administración intravenosa (IV) en ratones C57BL/6 hembra.

IV	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	68.320	71.760	82.860	4.188	6.659	5.408
6	45.020	48.560	60.660	1.427	1.487	1.707
24	16.900	23.820	28.340	0.991	0.913	1.646
48	9.472	20.620	20.540	0.510	0.843	1.365
72	5.048	12.118	14.440	0.303	0.996	0.842
96	2.144	5.404	7.926	0.103	0.365	0.445

Tabla 17: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:45 a lo largo del tiempo después de una única administración subcutánea (SC) en ratones C57BL/6 hembra.

SC	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
2	13.536	12.032	12.512	3.674	3.373	3.499
6	21.780	20.540	22.120	3.155	2.770	3.161
24	18.020	27.580	26.520	1.712	3.014	2.732
48	8.856	20.060	18.980	0.469	1.183	1.248
72	4.348	18.180	15.260	0.329	1.697	1.065
96	1.786	9.866	9.676	0.164	0.907	0.854

ES 3 011 982 T3

Tabla 18: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:45 a lo largo del tiempo después de una única administración intravenosa (IV) en ratones C57BL/6 hembra.

IV	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	76.800	69.080	69.560	7.469	7.052	7.981
6	56.180	57.040	59.460	5.162	5.781	5.527
24	21.120	30.860	30.680	1.668	2.444	2.480
48	10.398	22.560	21.500	0.855	2.104	2.152
72	4.794	18.800	16.180	0.368	1.880	1.030
96	1.986	10.854	10.284	0.134	0.837	0.707

Tabla 19: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:46 a lo largo del tiempo después de una única administración subcutánea (SC) en ratones C57BL/6 hembra.

SC	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
2	3.420	2.850	3.720	0.376	0.311	0.337
6	5.718	6.522	7.516	0.730	0.704	0.609
24	4.792	8.504	9.154	0.398	0.708	0.858
48	2.146	5.766	6.910	0.389	0.541	0.455
72	0.689	2.818	3.286	0.061	0.260	0.336
96	0.205	1.270	1.516	0.026	0.137	0.186

Tabla 20: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:46 después de una única administración intravenosa (IV) en ratones C57BL/6 hembra.

IV	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	55.525	42.525	57.875	15.521	10.592	15.368
6	27.125	24.750	34.950	5.185	4.660	6.461
24	4.933	9.423	11.280	0.255	0.893	0.879
48	1.355	5.023	5.893	0.125	0.278	0.702
72	0.510	2.623	2.968	0.049	0.269	0.329
96	0.196	1.345	1.593	0.020	0.155	0.171

Tabla 21: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de la SEQ ID NO:44 después de una única administración subcutánea (SC) en ratones C57BL/6 hembra.

SC	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
2	6.340	6.124	6.792	2.029	1.845	2.289
6	8.534	10.310	10.672	1.697	1.721	1.876
24	4.646	10.098	10.018	0.969	1.801	1.874
48	1.879	6.264	6.480	0.486	1.171	1.162
72	0.691	3.678	3.694	0.153	0.766	0.760
96	0.194	1.758	1.860	0.048	0.304	0.331

Tabla 22: Concentración plasmática (µg/ml) y error estándar de la media (SEM, n = 3) de SEQ ID NO:44 después de una única administración intravenosa (IV) en ratones C57BL/6 hembra.

IV	Concentración (µg/ml)			SEM		
Tiempo (h)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)	HGE (GLP1)	ALV (HSA)	TDT (GDF15)
0.5	57.920	53.300	60.760	4.648	3.971	4.489
6	29.560	33.360	37.400	2.266	2.199	2.176
24	4.564	10.420	10.684	0.424	0.393	0.560
48	1.300	6.276	6.022	0.217	0.312	0.250
72	0.540	3.396	3.562	0.040	0.257	0.195
96	0.159	1.784	1.804	0.025	0.180	0.123

El análisis farmacocinético no compartimental (NCA) usando los datos de las Tablas 15-22 reveló una vida media terminal de 14-23 horas para el péptido GLP1 o la variante del péptido GLP1, de 22-49 horas para la proteína GDF15 o la variante de la proteína GDF15, y de 22-47 horas para la proteína HSA después de la administración SC e IV de las cuatro proteínas de fusión GLP1-GDF15 ensayadas en ratones C57BL/6 (Tabla 23).

Tabla 23: Estimación de la vida media terminal de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 después de administración IV y SC de 5 mg/kg en ratones C57BL/6 hembra.

SEQ ID NO:	Región	Vida media (hora) NCA Dosificación SC	Vida media (hora) NCA Dosificación IV
50	GDF15	39.4	39.8
50	CLP1	22.5	24.4
50	HSA	29.5	24.8
45	GDF15	49.4	46.7
45	GLP1	21.8	20.1
45	HSA	46.9	38.3
46	GDF15	21.9	25.4
46	CLP1	14.2	17.2
46	HSA	22.0	25.3

(continuación)

SEQ ID NO:	Región	Vida media (hora) NCA Dosificación SC	Vida media (hora) NCA Dosificación IV
44	GDF15	26.7	28.4
44	GLP1	15.8	15.2
44	HSA	28.8	26.5

Farmacocinética en monos

Las proteínas de fusión GLP1-GDF15 derivadas de las SEQ ID NO:33, 50, 45, 46 y 44 se administraron a monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macho sin tratamiento previo a una dosis de 0,5 mg/kg SC en PBS, pH 7. Se recogieron muestras de sangre, se procesó el plasma y se midieron las concentraciones del fármaco hasta 21 días usando bioanálisis por inmunoensayo. La estrategia de inmunoensayo incluyó un anticuerpo de captura anti-GDF15 y detección con un anticuerpo que reconoce GLP1 intacto ("Activo") o un anticuerpo que reconoce HSA ("Total"). El perfil de concentración plasmática-tiempo del fármaco se resume en las Tablas 24 y 25.

Tabla 24: Concentración plasmática media (Med, n = 3) (ng/ml) de las SEQ ID NO:33, 50, 45, 46 y 44 activas a lo largo del tiempo después de una única administración SC en monos cynomolgus como se determina por inmunoensayo.

	Punto temporal	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33
GLP1 Activo (ng/ml)	Predosis	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50	<1.25
	6 horas	1747.72	2530.81	2457.83	1667.36	1880.02
	24 horas	3057.60	3492.18	3946.41	3191.24	3151.63
	48 horas	3177.96	3416.86	3655.95	3643.12	3448.62
	72 horas	2689.49	3013.14	3015.11	2991.62	2949.14
	120 horas	1501.85	1669.39	1402.39	2029.62	1991.88
	168 horas	813.84	1020.04	725.75	1208.07	1246.28
	240 horas	378.81	471.08	265.28	564.57	583.56
	336 horas	137.73	192.90	81.18	197.74	211.92
	432 horas	53.16	61.11	25.47	70.28	79.78
	528 horas	23.10	35.96	10.60	25.70	36.59

Tabla 25: Concentración plasmática media (Med, n = 3) (ng/ml) del SEQ ID NO:33, 50, 45, 46, y 44 total a lo largo del tiempo después de una única administración SC en monos cynomolgus determinada por inmunoensayo.

	Punto temporal	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33
Total (ng/ml)	Predosis	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00
	6 horas	1628.27	2299.98	2139.00	1427.28	1726.39
	24 horas	3350.99	3873.18	4639.00	3430.23	3451.14
	48 horas	3956.92	4427.70	5607.40	4892.71	4542.34
	72 horas	3672.20	4399.17	5310.44	4303.43	4514.28
	120 horas	2699.22	3612.21	4616.56	4133.96	4114.96
	168 horas	1930.94	2745.57	3902.73	3237.20	3431.95
	240 horas	1261.95	1964.84	2820.20	2353.01	2504.95

(continuación)

	Punto temporal	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33
5 Total (ng/ml)	336 horas	719.72	1357.09	2005.69	1597.70	1682.87
	432 horas	442.57	806.98	1399.11	964.85	1096.51
	528 horas	328.35	532.75	961.88	708.00	879.52

El análisis farmacocinético de los datos de las Tablas 24 y 25 reveló una vida media terminal de 2-3 días para la molécula activa y de 5-8 días para la molécula total en monos cynomolgus después de la administración SC (Tabla 26).

Tabla 26: Vida media terminal de las SEQ ID NO:50, 33, 45, 46 y 44 después de la administración SC de 0,5 mg/kg en monos cynomolgus.

SEQ ID NO:	Detección	vida media (d)
44	Activa	3.2
	Total	6.6
46	Activa	2.6
	Total	4.6
50	Activa	2.9
	Total	6.6
45	Activa	2.3
	Total	7.6
33	Activa	3.0
	Total	7.8

Ejemplo 11: Potencia in vivo de las proteínas de fusión GLP1-GDF15

Evaluación de la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6 macho: El propósito de este experimento era demostrar el efecto farmacodinámico in vivo de las moléculas correspondientes a las SEQ ID NO:50, 33, 49, 45, 46 y 44 sobre la inhibición de la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6. Se midió la ingesta de alimentos durante 24 horas antes y después de la administración subcutánea de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (artículos de prueba) o controles (vehículo de PBS o dulaglutida) entre las 4:00 y las 5:00 pm. El cambio en el peso de la comida de cada jaula se registró cada 24 horas. Los resultados se expresan como el cambio porcentual en la ingesta de alimentos en comparación con las 24 horas anteriores al tratamiento y dependen parcialmente de la concentración circulante de cada artículo de prueba usado en el estudio (FIG. 4). La concentración circulante de los artículos de prueba se determinó 24 horas después de la administración mediante captura por inmunofluorescencia-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS. Se monitorizaron péptidos tripticos seleccionados, concretamente, ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK) (SEQ ID NO:79), HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77), y HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78), y TDT (TDTGVSLQTYDDLAK) (SEQ ID NO:80), que están localizados cerca del extremo N-terminal de la proteína HSA, del extremo N-terminal del péptido GLP1 o de la variante del péptido GLP1, y del extremo C-terminal de la proteína GDF15 o de la variante de la proteína GDF15, respectivamente. El péptido VVS (VVSVLTVLHQDWLNGK) (SEQ ID NO:82) se localiza en la porción Fc de dulaglutida. La monitorización de estos péptidos sustitutos permitió la evaluación farmacocinética de cada región (GLP1, HSA, GDF15) de las proteínas de fusión GLP1-GDF15. Las concentraciones plasmáticas del fármaco se muestran en la FIG. 5. Los resultados indicaron que la administración subcutánea de las SEQ ID NO:50, 33, 49, 45, 46 y 44 a ratones C57BL/6 inhibió significativamente la ingesta de alimentos con respecto a los animales tratados con vehículo.

Evaluación de los efectos de la ingesta de alimentos mediada por GLP1R en ratones GFRAL KO: La inhibición de la ingesta de alimentos en ratones C57BL/6 es el resultado del acoplamiento tanto de GLP1R como de GDF15R (GFRAL). Para determinar los efectos específicos de GLP1R de las SEQ ID NO:50, 33, 45, 46 y 44 sobre la ingesta de alimentos, se usaron ratones que carecían de GFRAL. El objetivo de estos experimentos era determinar el grado de acoplamiento del GLP1R por las proteínas de fusión cuando se administraron a una dosis que se predijo que sería eficaz para las fusiones HSA-GDF15 en ratones (FIGS. 1 y 2 y US20170327560A1). Se midió la ingesta de alimentos

durante 24 horas antes y después de la administración subcutánea de proteínas de fusión GLP1-GDF15 (artículos de prueba: 3 y 10 nmol/kg) o controles (vehículo de PBS o dulaglutida) entre las 4:00 y las 5:00 pm. El cambio en el peso de la comida de cada jaula se registró cada 24 horas. La concentración circulante de moléculas de fusión que contenían el péptido GLP1 intacto o variantes del péptido GLP1 se determinó 24 horas después de la administración mediante captura por inmunoafinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS y monitorización selectiva de los péptidos tripticos, HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) o HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78) que se localizan cerca del extremo N-terminal del péptido GLP1 o de la variante del péptido GLP1. Los resultados se representan gráficamente como el cambio porcentual en la ingesta de alimentos frente a la concentración plasmática del péptido HGE (péptido GLP1 intacto o variante del péptido GLP1) (FIGS. 6, 7 y 8). Los resultados indicaron que la administración de proteínas de fusión que tenían las SEQ ID NO: 50, 33, 45, 46, y 44 dio como resultado un acoplamiento de GLP1R a dosis que habían demostrado previamente que eran eficaces para HSA-GDF15. Sorprendentemente, el acoplamiento de GLP1R produjo una respuesta farmacodinámica deseada similar a la del agonista de Fc-GLP1 dulaglutida a pesar de tener una exposición de la fracción GLP1 10-30 veces mayor que la de dulaglutida. Si el componente GLP1 de la proteína de fusión hubiera sido tan potente como la dulaglutida in vivo, el acoplamiento de GLP1R habría sido mucho mayor de lo deseado, lo que podría provocar los efectos adversos previstos en humanos, como náuseas y emesis. Por lo tanto, la administración de péptidos GLP1 en forma de fusiones con HSA-GDF15 influye en la potencia in vivo en el GLP1R de una manera que permite el equilibrio deseado de los dos agonistas.

Evaluación de la tolerancia a la glucosa mediada por GLP1R en ratones DIO en ayunas: El agonismo del GLP1R en el páncreas da como resultado una mejora de la secreción de insulina y la captación de glucosa aumentada, y puede medirse usando una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa en ratones obesos inducidos por dieta. El objetivo de estos experimentos era determinar el grado de acoplamiento del GLP1R por las proteínas de fusión cuando se administraron a una dosis que se predijo que sería eficaz para las fusiones HSA-GDF15 en ratones (FIGS. 1 y 2 y US20170327560A1). Los ratones C57BL/6 macho se mantuvieron con la Dieta de Investigación D12492 desde las 6 semanas de edad hasta el inicio de la dosificación a las 20 semanas de edad para inducir la obesidad. Se usaron mediciones de glucosa en sangre y de peso corporal para distribuir aleatoriamente a los ratones en grupos de tratamiento. A las 4.00 pm, los ratones se trasladaron a jaulas limpias con acceso a agua; no se les suministró comida mientras duró el estudio. Se administraron por vía subcutánea artículos de control (vehículo PBS y dulaglutida) y de prueba (SEQ ID NO:33, 50, 49, 45, 46, 44 y 36) (1, 3 y 10 nmol/kg) en el momento de retirar la comida. 17 horas después de la administración, se recogió la glucosa de referencia y se administró 1 g de glucosa por vía interperitoneal por kg de peso corporal. Se midió la glucosa en sangre a los 10, 30, 60 y 120 minutos después del bolo de glucosa. La concentración plasmática circulante de moléculas de fusión que contenían el péptido GLP1 o variantes del péptido GLP1 intactos se determinó inmediatamente después del punto temporal de 120 minutos mediante captura por inmunoafinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS y seguimiento selectivo de los péptidos tripticos, HGE-1 (HGEFTFTSDVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:77) o HGE-2 (HGEFTFTSDLSK) (SEQ ID NO:78) que se localizan cerca del extremo N-terminal del péptido GLP1 o de la variante del péptido GLP1. La glucosa se representó gráficamente en función del tiempo y se calculó para cada animal el área bajo la curva tras normalizarla con los niveles de referencia de glucosa (Delta AUC). Los resultados se representan en gráficos como el cambio porcentual en Delta AUC (en comparación con el tratamiento con vehículo) frente a la concentración plasmática del péptido HGE (agonista de GLP1 intacto) (FIGS. 9, 10, 11 y 12). Los resultados indicaron que la administración de proteínas de fusión que tenían las SEQ ID NO:33, 50, 49, 45, 46, 44, y 36 dio como resultado un acoplamiento del GLP1R a dosis que habían demostrado con anterioridad que eran eficaces para HSA-GDF15. Sorprendentemente, el acoplamiento del GLP1R produjo una respuesta farmacodinámica deseada similar a la del agonista Fc-GLP1 dulaglutida, a pesar de tener una exposición de la fracción GLP1 10-30 veces mayor que la de dulaglutida. Si el componente GLP1 de la proteína de fusión hubiera sido tan potente como la dulaglutida in vivo, el acoplamiento del GLP1R habría sido mucho mayor de lo deseado, lo que podría provocar los efectos adversos previstos en humanos, como náuseas y emesis. Por lo tanto, la administración de péptidos GLP1 como fusiones con HSA-GDF15 influye en la potencia in vivo del GLP1R de manera que permite el equilibrio deseado entre los dos agonistas.

Evaluación del acoplamiento de GLP1R en primates con una infusión graduada de glucosa: Se usó la secreción de insulina tras una infusión intravenosa graduada de glucosa (GGI) en primates no humanos para evaluar el acoplamiento del GLP1R de las SEQ ID NO:45 y 44. El objetivo de estos experimentos era determinar el grado de acoplamiento del GLP1R por las proteínas de fusión cuando las proteínas de fusión se administraban a una dosis que se había predicho que sería eficaz para las fusiones HSA-GDF15 en primates no humanos (Mullican et al., 2017 y US20170327560A1). Los procedimientos de GGI se llevaron a cabo en monos cynomolgus sedados después de un ayuno nocturno de 16 horas para comparar las respuestas de referencia y de tratamiento con un periodo de recuperación de 14 días entre los dos procedimientos de GGI. El día 1, a los animales se les dosificó con el vehículo inmediatamente después de retirarles la comida. El día 2, se anestesió a los animales y se estableció el valor de referencia con dos muestras de sangre recogidas con 10 minutos de diferencia. La GGI se inició a los 0 minutos con una velocidad de infusión de glucosa de 8 mg/kg/min, seguido de infusiones de 12, 16 y 24 mg/kg/min. Cada velocidad de infusión se administró durante un periodo de 40 minutos. Se recogieron muestras de sangre a intervalos de 20 minutos para medir la glucosa, la insulina y el péptido C, los resultados se representaron gráficamente en función del tiempo y se determinó el área bajo la curva (AUC) para cada analito medido en cada animal. A continuación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de artículos de prueba sobre la base de su tasa de

secreción de insulina (ISR) de referencia de GGI1. El día 15, se dosificó a los animales el artículo de prueba a distintas concentraciones (de 0,1 a 1,1 mg/kg de proteínas de fusión y de 0,016 a 0,1 de dulaglutida) antes de pasar la noche en ayunas. La segunda GGI (GGI2) se realizó el día 16 como se ha descrito para el día 2. La exposición al compuesto se evaluó en muestras de plasma recogidas en el punto temporal 0 antes de la infusión de glucosa mediante inmunoensayo diseñado específicamente para monitorizar artículos de prueba con péptido GLP1 intacto o variantes peptídicas. Los datos de la FIG. 13 se notifican como el cambio de veces inducido por el tratamiento en la AUC de ISR normalizado a la AUC de glucosa en comparación con el valor de referencia frente a la concentración plasmática del artículo de prueba con GLP1 intacto. Se usó dulaglutida como agonista de Fc-GLP1 de referencia. Los resultados indicaron que la administración de proteínas de fusión que tenían las SEQ ID NO:45 y 44 dio como resultado el acoplamiento del GLP1R a dosis que previamente habían demostrado ser eficaces para el HSA-GDF15. Sorprendentemente, el acoplamiento de GLP1R produjo una respuesta farmacodinámica deseada similar a la del agonista de Fc-GLP1 dulaglutida, a pesar de tener una exposición de la fracción de GLP1 10-30 veces mayor que la dulaglutida. Si el componente de GLP1 de la proteína de fusión hubiera sido tan potente como la dulaglutida in vivo, el acoplamiento de GLP1R habría sido mucho mayor de lo deseado, lo que podría provocar los efectos adversos previstos en humanos, como náuseas y emesis. Por lo tanto, la administración de péptidos GLP1 en forma de fusiones con HSA-GDF15 influye en la potencia in vivo del GLP1R de una manera que permite el equilibrio deseado de los dos agonistas.

Los resultados mostrados en las FIGS. 6-13 demuestran que la actividad o potencia in vivo de GLP1 en especies preclínicas se reduce en los agonistas duales homodiméricos GLP1-GDF15 en comparación con el péptido GLP1 fusionado con Fc de dulaglutida. Esto permite el equilibrio de ambos agonistas (péptido GLP1 o variante del péptido GLP1 y proteína GDF15 o variante de la proteína GDF15) en una molécula; permitiendo, por lo tanto, la administración de un péptido GLP1 o variante del péptido GLP1 a una concentración eficaz que también logra la exposición de la proteína GDF15 o variante de la proteína GDF15 dentro del intervalo terapéutico previsto.

Evaluación de la eficacia para la pérdida de peso de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 después de dosis repetidas en ratones: Se comprobó la capacidad de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 para provocar pérdida de peso en ratones obesos inducidos por dieta. A los ratones se les administraron por vía subcutánea concentraciones variables de los artículos de prueba (SEQ ID NO:45 y 44), dulaglutida o un vehículo de control diariamente durante siete días. El peso corporal se monitorizó durante todo el estudio y la FIG. 14 muestra el cambio porcentual en el peso corporal a lo largo del tiempo con respecto al día 0 (justo antes de la primera dosis). La concentración circulante de los artículos de prueba se determinó después de siete días de tratamiento mediante captura por inmunoafinidad-digestión con tripsina-análisis LC-MS/MS. Se monitorizaron péptidos tripticos seleccionados, concretamente, ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK) (SEQ ID NO:79), HGE-1 (HGETFTSDVSSYLEEQAQK) (SEQ ID NO:77), y HGE-2 (HGETFTSDLSK) (SEQ ID NO:78), y TDT (TDTGVSLLQTYDDLLAK) (SEQ ID NO:80), que están localizados cerca del extremo N-terminal de la proteína HSA, del extremo N-terminal del péptido GLP1 o de la variante del péptido GLP1, y del extremo C-terminal de la proteína GDF15 o de la variante de la proteína GDF15, respectivamente. El péptido VVS (VVSVLTVLHQDWLNGK) (SEQ ID NO:82) se localiza en la porción Fc de dulaglutida. El seguimiento de estos péptidos sustitutos permitió la evaluación farmacocinética de cada región (GLP1, HSA, GDF15) de las proteínas de fusión GLP1-GDF15. Las concentraciones plasmáticas del fármaco se muestran en la FIG. 15. Los resultados indicaron que la administración repetida de las SEQ ID NO:45 y 44 lleva a la pérdida de peso en ratones obesos inducidos por dieta de una manera dependiente de la concentración.

Evaluación de los efectos de la ingesta de alimentos de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 en primates no humanos.

Se probó la capacidad de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 para disminuir la ingesta de alimentos en monos cynomolgus espontáneamente obesos. A los sujetos se les administraron por vía subcutánea concentraciones variables de artículos de prueba con y sin una fracción activa de GLP1 (SEQ ID NOS: 44 y 83, respectivamente; SEQ ID NO:83, que comprende un péptido HSA fusionado a un conector AP10 fusionado a un péptido GDF15, había sido divulgado previamente en la Patente de Estados Unidos N° 10.336.812) o vehículo QW durante un periodo de 4 semanas. La ingesta de alimentos se monitorizó antes de la dosis y durante todo el estudio. En la FIG. 16 se muestra el cambio porcentual de 3 días en la ingesta de alimentos al inicio del estudio y después de cada administración del artículo de prueba. La concentración de las SEQ ID NO: 44 y 83 en el plasma de mono cynomolgus durante el estudio se determinó usando dos métodos de inmunoensayo separados para detectar la molécula "total" (detección de HSA) y la fracción "activa" de GLP1 (detección del péptido N-terminal de GLP1). En las FIGS. 17 y 18 se muestran las concentraciones plasmáticas del fármaco. Los resultados indicaron que la administración de las SEQ ID NO: 44 y 83 reduce la ingesta de alimentos en primates no humanos espontáneamente obesos.

Evaluación de la ingesta de alimentos y de los efectos sobre el peso corporal de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 tras una escalada de dosis de 21 días en primates no humanos.

Se probó en monos cynomolgus espontáneamente obesos la capacidad de las proteínas de fusión GLP1-GDF15 para disminuir la ingesta de alimentos y provocar pérdida de peso. A los sujetos se les administraron por vía

subcutánea artículos de prueba que contenían fracciones activas tanto de GDF15 como de GLP1, sólo activa de GDF15 o sólo activa de GLP1 (SEQ ID NO: 44, 83, 84, respectivamente; SEQ ID NO:84 comprende un péptido GLP1 fusionado a un péptido conector AP5 fusionado a un péptido HSA fusionado a un péptido conector AP10 fusionado a un péptido GDF15 con una mutación I89R; el péptido GDF15 con una mutación I89R se había divulgado previamente en la Patente de Estados Unidos N° 10.336.812) cada tres días durante un periodo de 21 días. La dosis inicial administrada el día 0 fue de 0,7 nmol/kg y se fue aumentando en cada administración hasta 20 nmol/kg. En la FIG. 19 se muestra la ingesta diaria de alimentos antes de la dosificación, durante el periodo de tratamiento de 21 días y durante el periodo de reposo farmacológico del artículo de prueba. El peso corporal se monitorizó durante todo el estudio y la FIG. 20 muestra el cambio porcentual en el peso corporal a lo largo del tiempo con respecto al valor de referencia. La concentración de los artículos de prueba en el plasma del mono cynomolgus durante el estudio se determinó usando dos métodos de inmunoensayo separados para detectar la molécula "total" (detección de HSA; SEQ ID NO: 44, 83, 84) y la fracción "activa" de GLP1 (detección del péptido de GLP1 N-terminal; sólo para las SEQ ID NO: 44 y 84). Las concentraciones plasmáticas del fármaco se muestran en las FIGS. 21 y 22. Los resultados indicaron que la administración repetida de las SEQ ID NO: 44, 83, 84 lleva a una reducción de la ingesta de alimentos y la consiguiente pérdida de peso en primates no humanos espontáneamente obesos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión de péptido similar al glucagón-1 (GLP1)/factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF15), en donde la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un péptido GLP1, un primer péptido conector, una proteína albúmina sérica, un segundo péptido conector y una proteína GDF15.
- 10 2. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde el péptido GLP1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-4.
3. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde el primer péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5-25.
- 15 4. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde la proteína albúmina sérica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:26 o la SEQ ID NO:27.
5. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde el segundo péptido conector comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:28-30.
- 20 6. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde la proteína GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32.
- 25 7. La proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:33-74 y 84, preferentemente, la proteína de fusión GLP1-GDF15 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44.
8. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión GLP1 -GDF15 de la reivindicación 1.
- 30 9. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8 o el vector de la reivindicación 9.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto con necesidad de ello, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debida a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética, y otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema.
- 45 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método para reducir la ingesta de alimentos en un sujeto con necesidad de ello.
- 50 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método para modular la actividad del receptor de GLP1, o de la actividad del receptor de GDF15 (GFRAL) en un sujeto con necesidad de ello.
- 55 15. Un kit que comprende la proteína de fusión GLP1-GDF15 de la reivindicación 1, el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8, y/o el vector de la reivindicación 9.

55

60

65

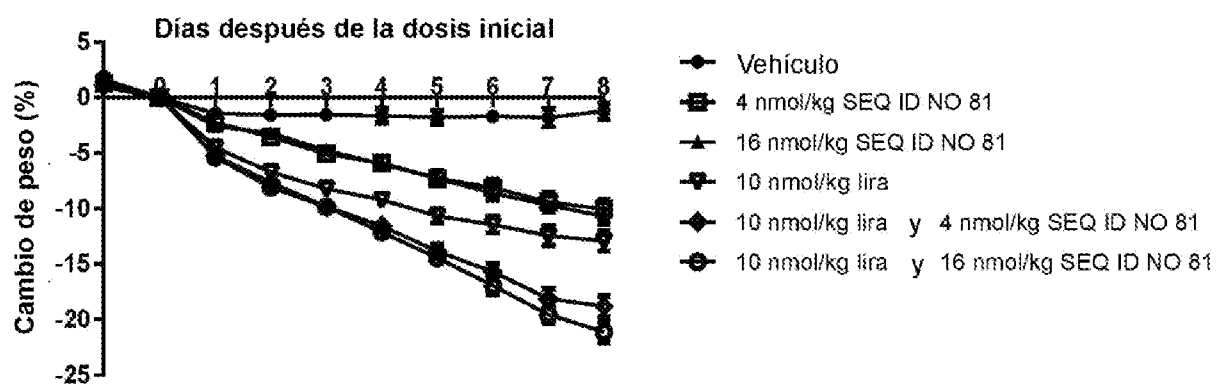


FIG. 1

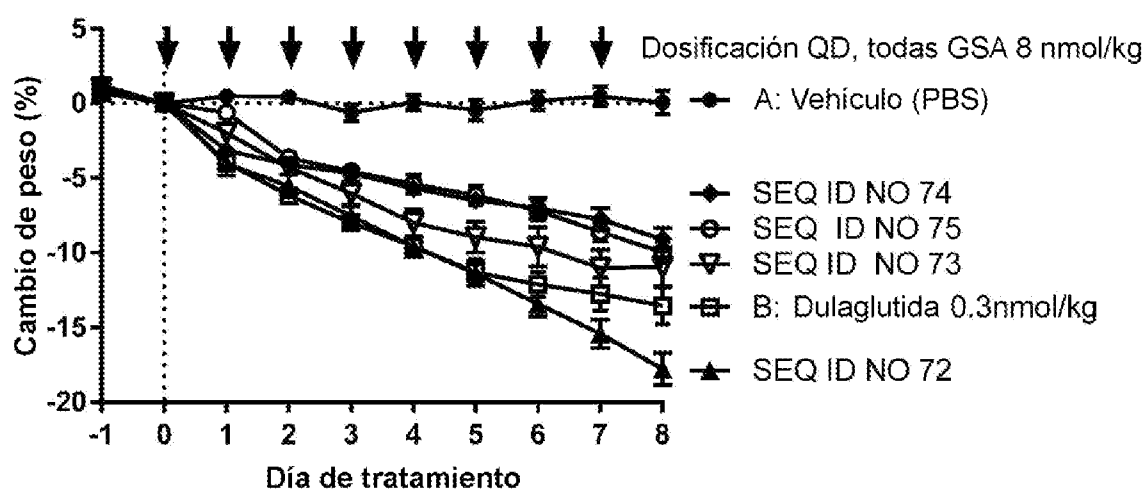


FIG. 2

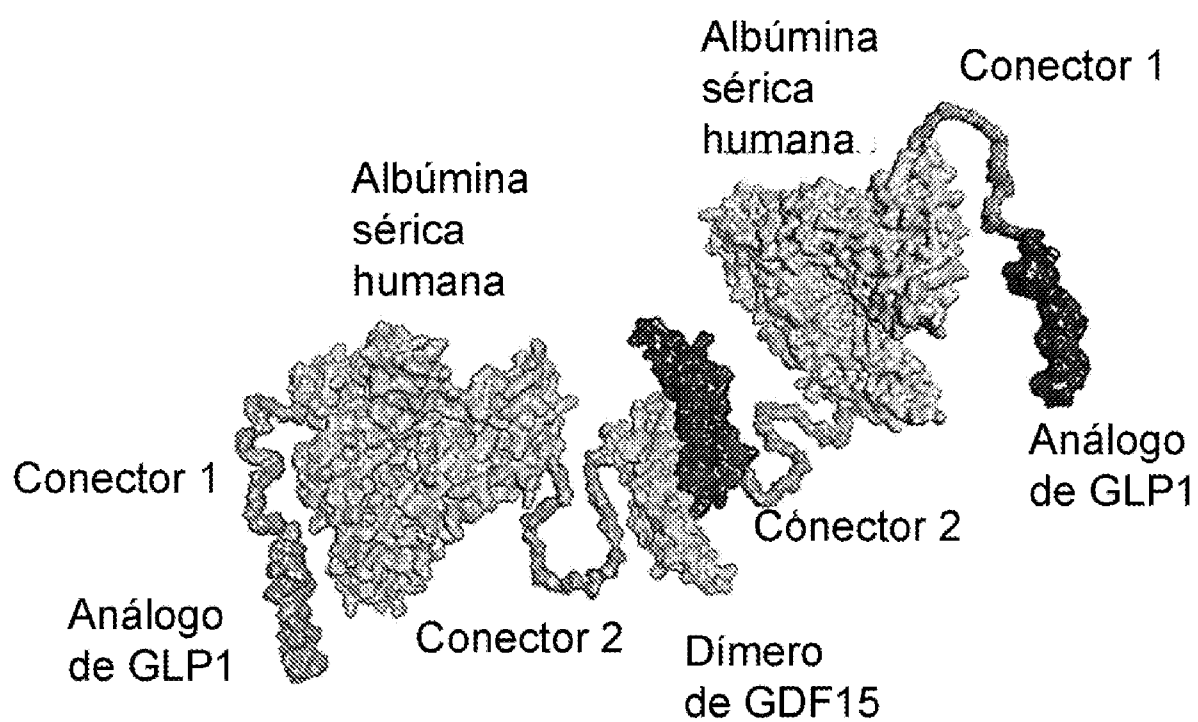


FIG. 3

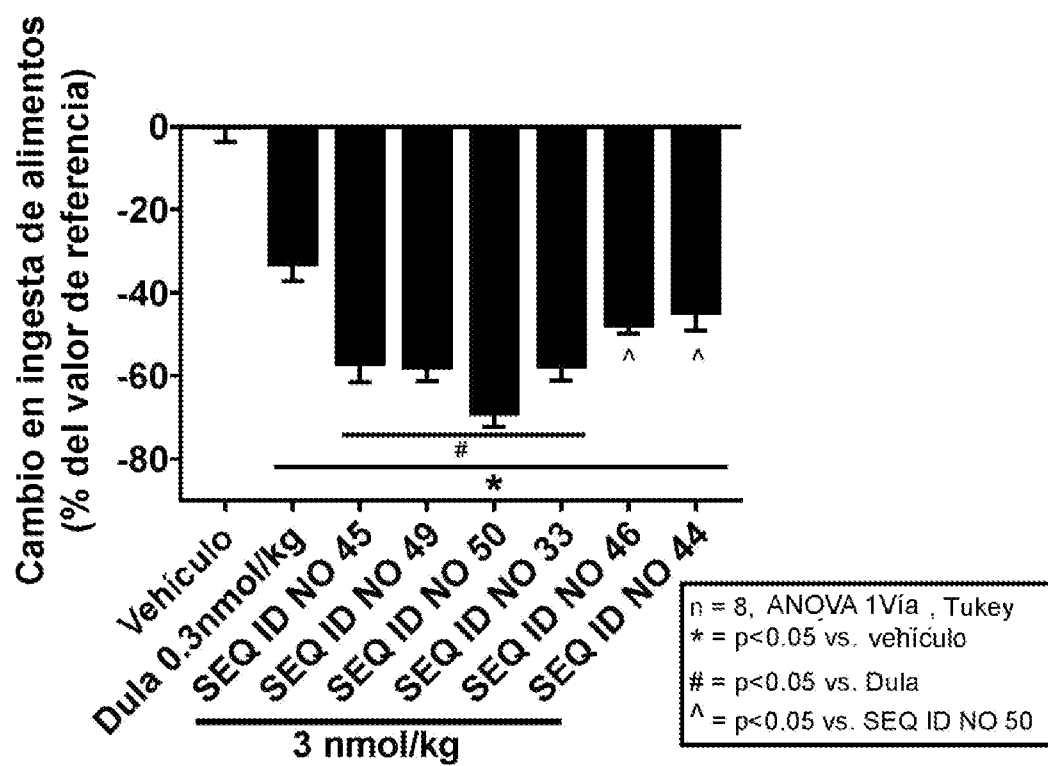


FIG. 4

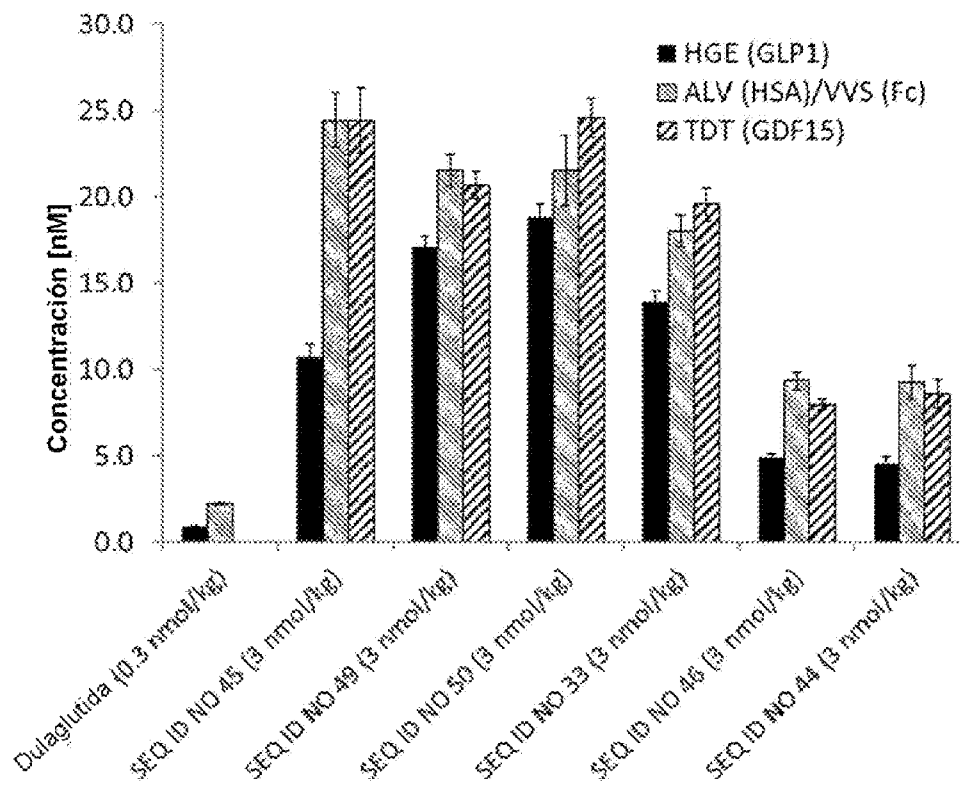


FIG. 5

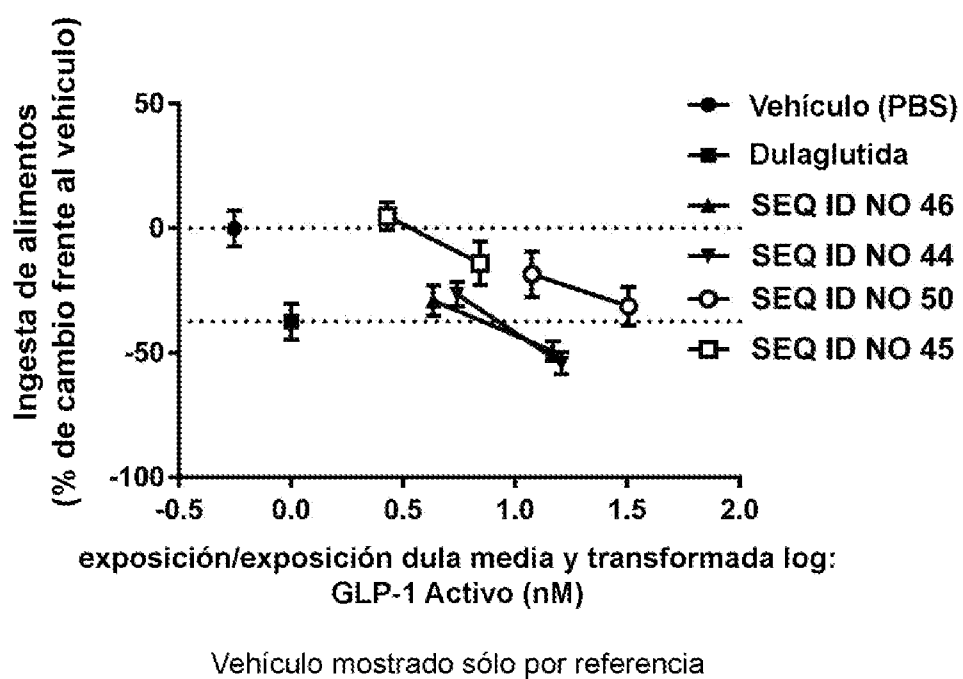
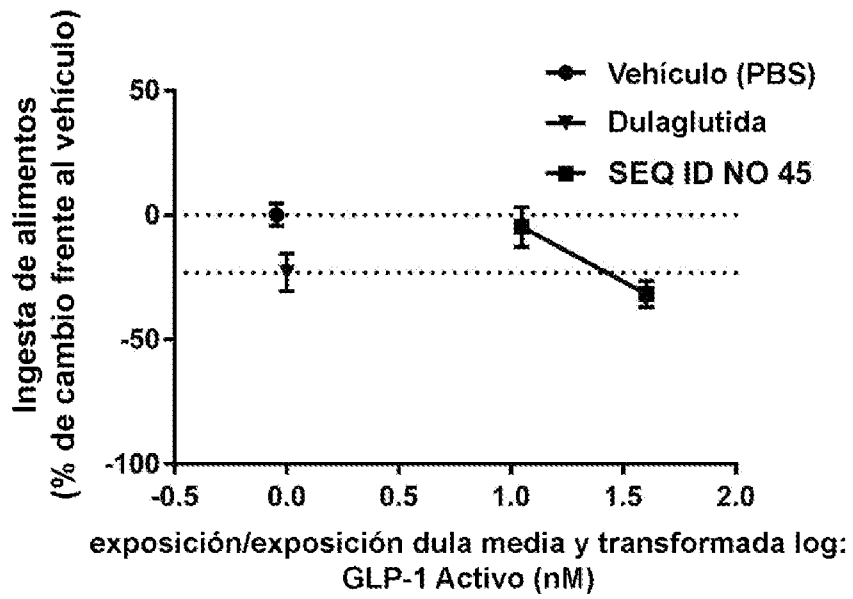
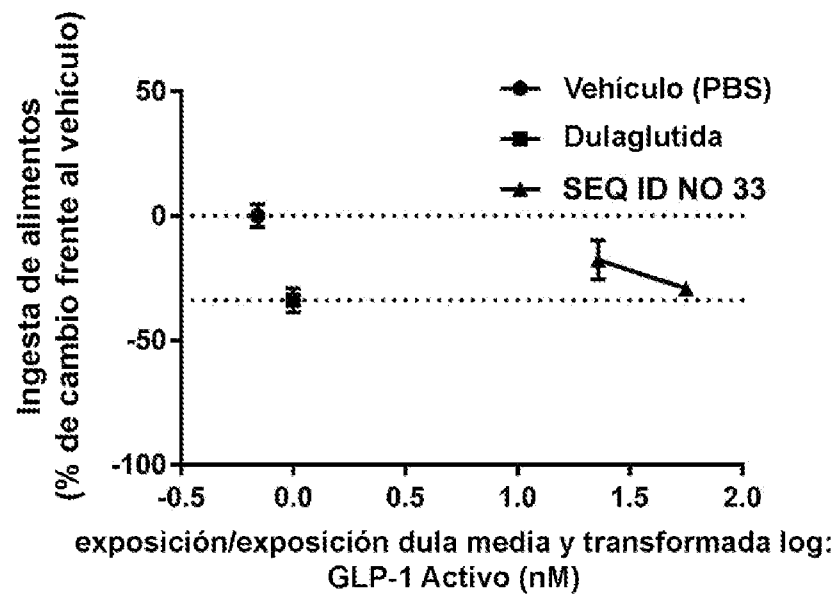


FIG. 6



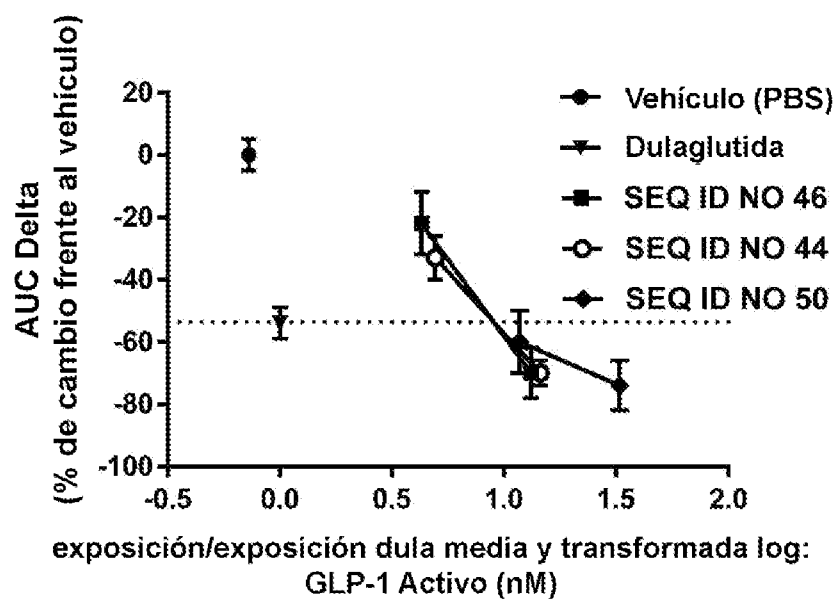
Vehículo mostrado sólo por referencia

FIG. 7



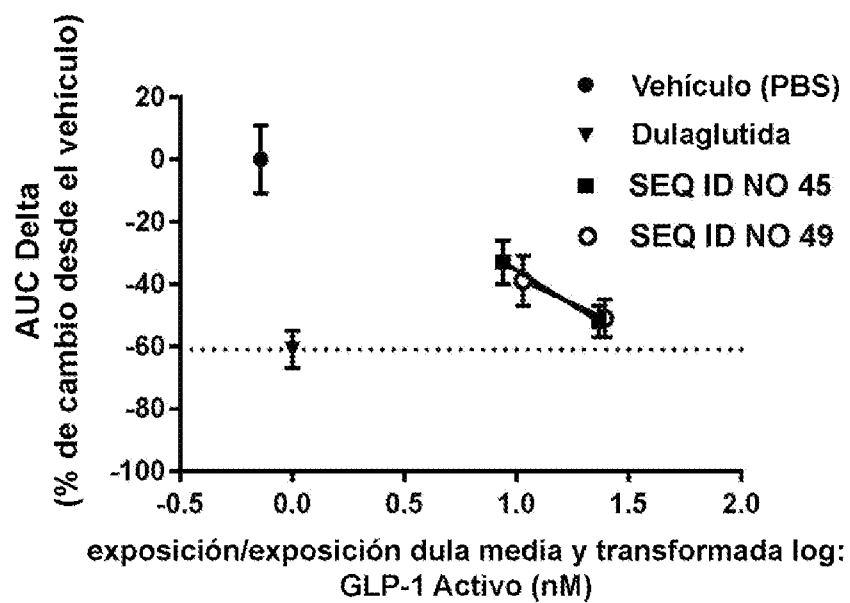
Vehículo mostrado sólo por referencia

FIG. 8



Vehículo mostrado sólo por referencia

FIG. 9



Vehículo mostrado sólo por referencia

FIG. 10

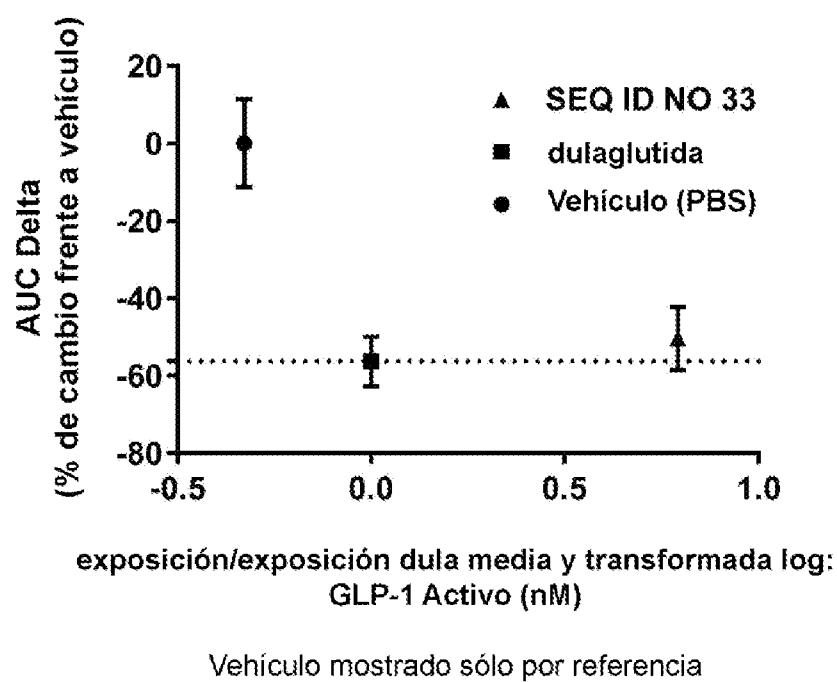
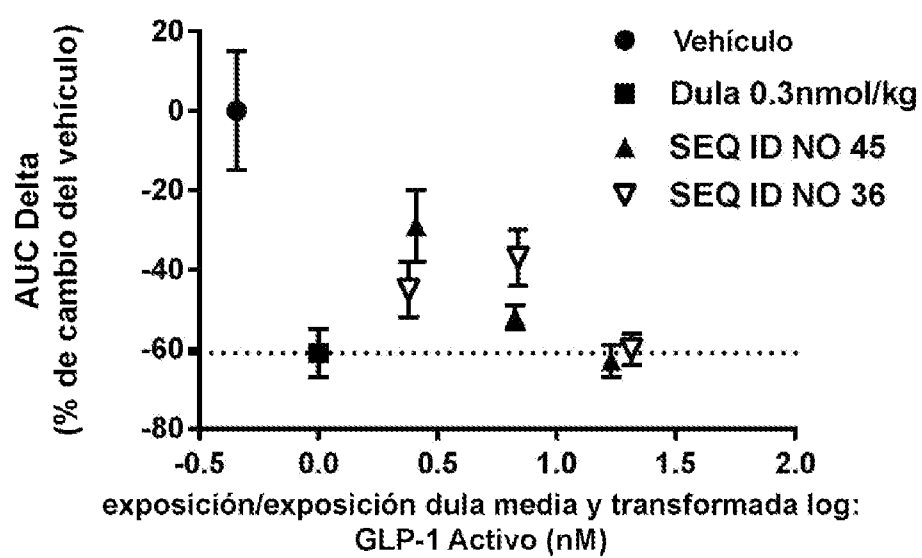


FIG. 11



Vehículo mostrado sólo por referencia

FIG. 12

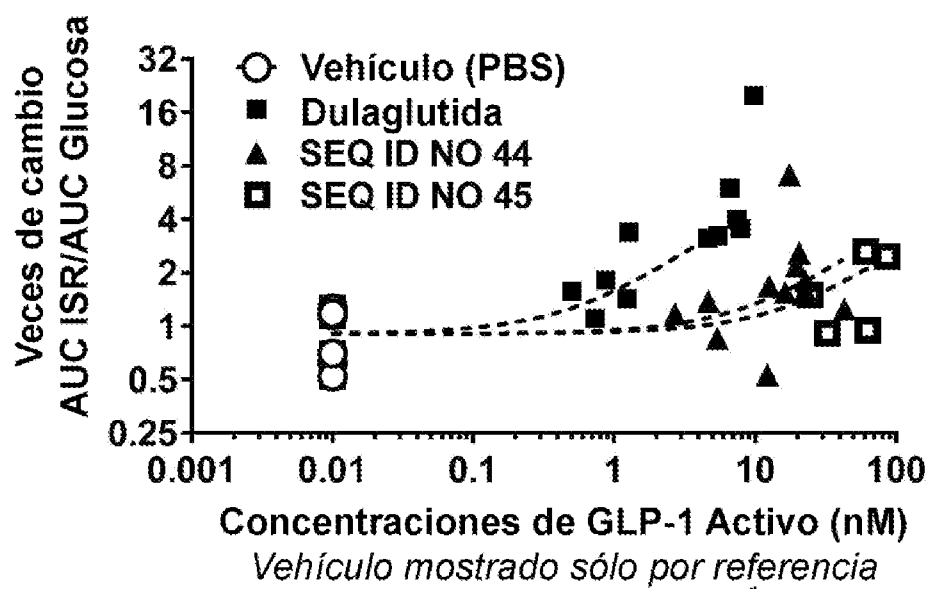


FIG. 13

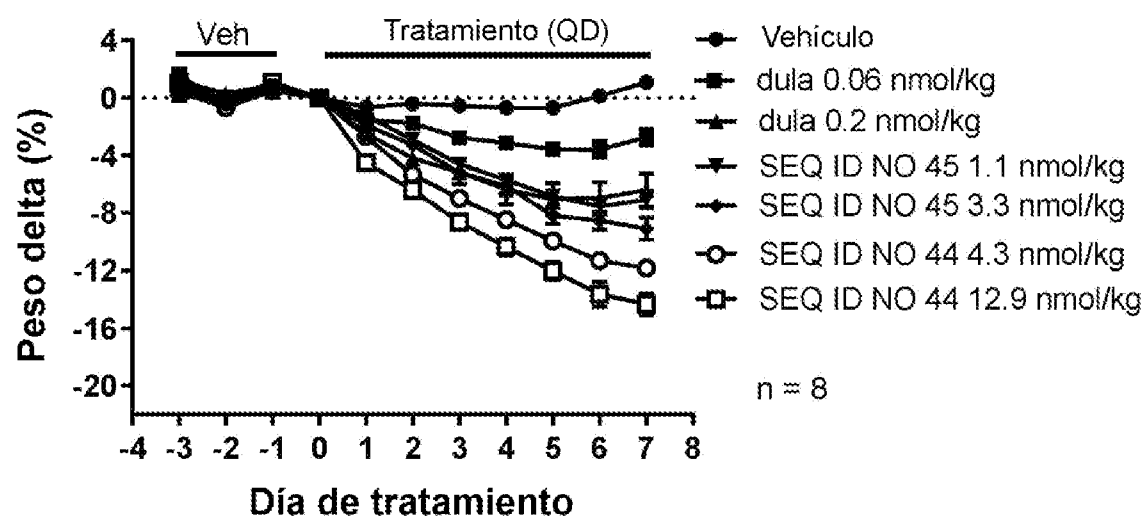


FIG. 14

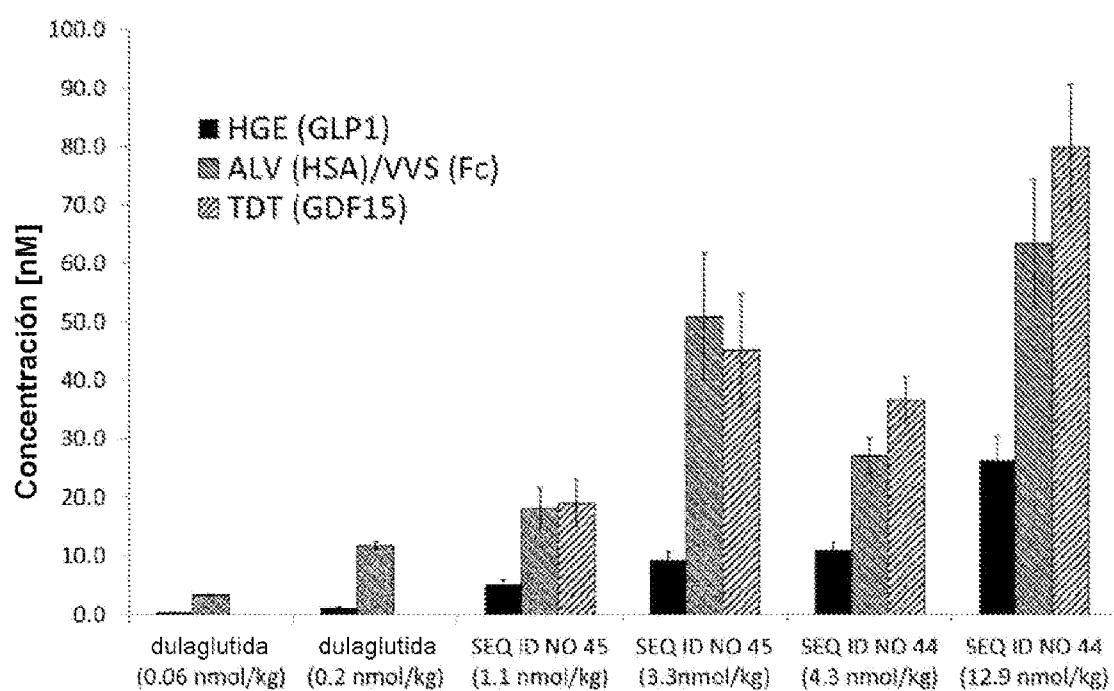


FIG. 15

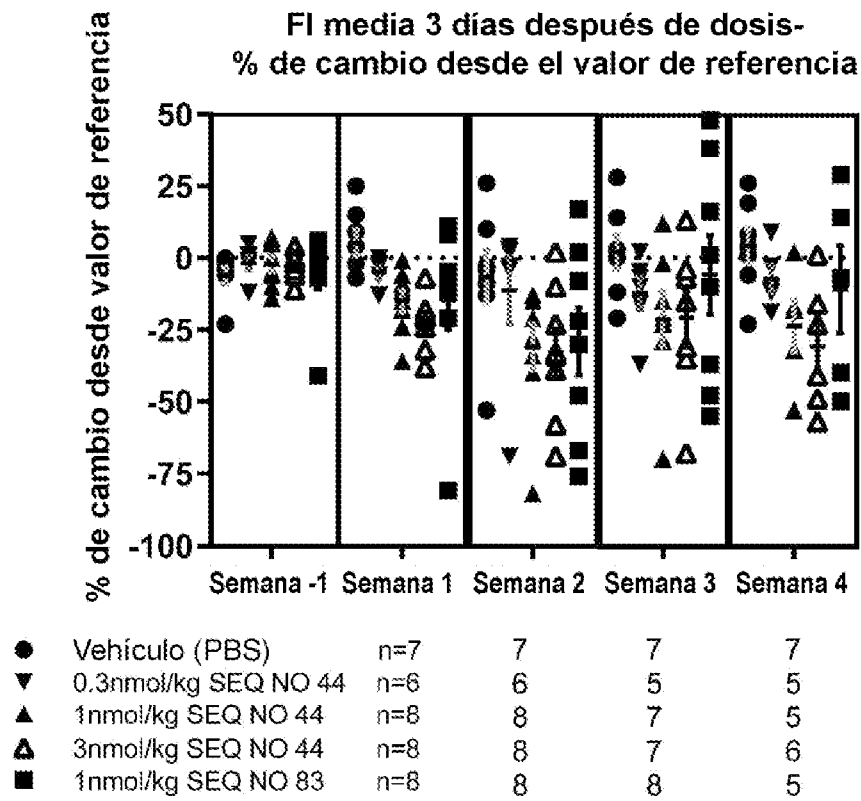


FIG. 16

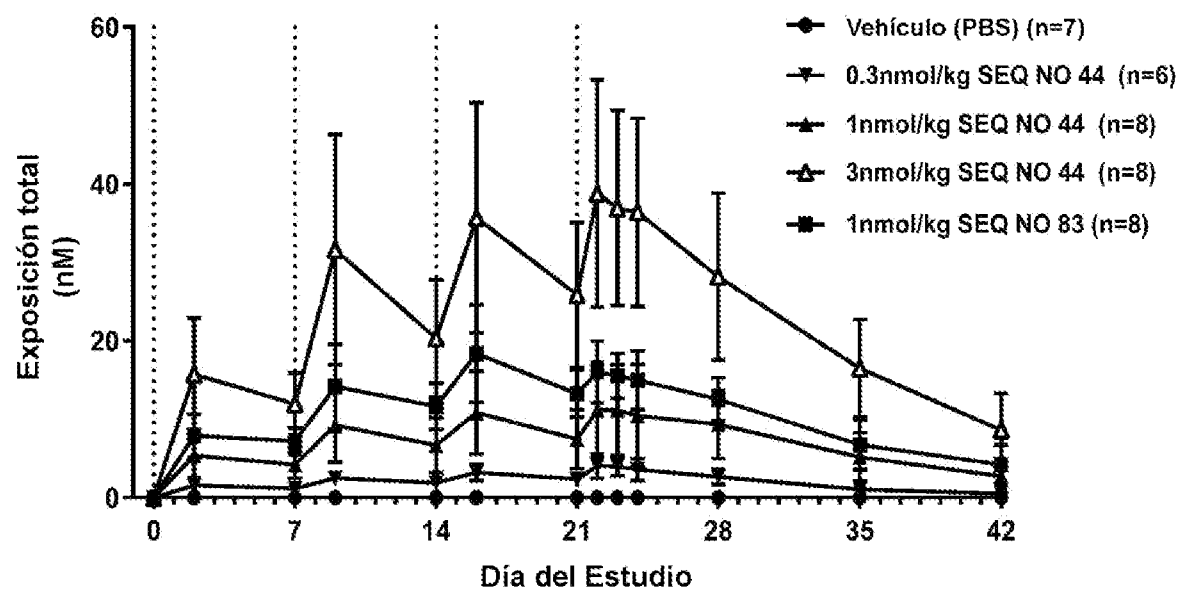


FIG. 17

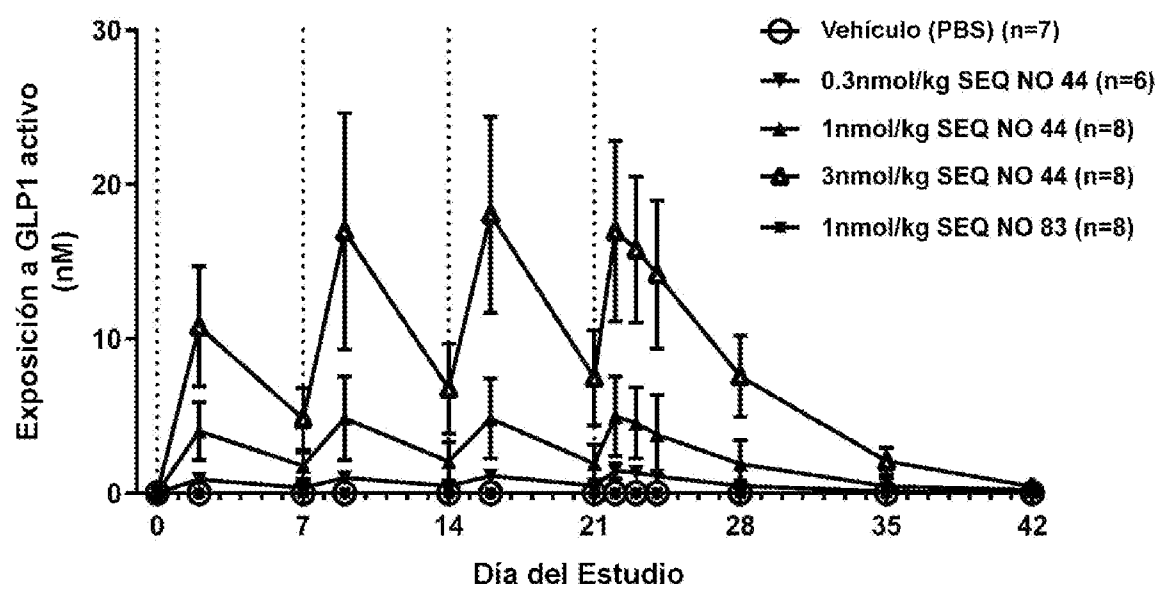


FIG. 18

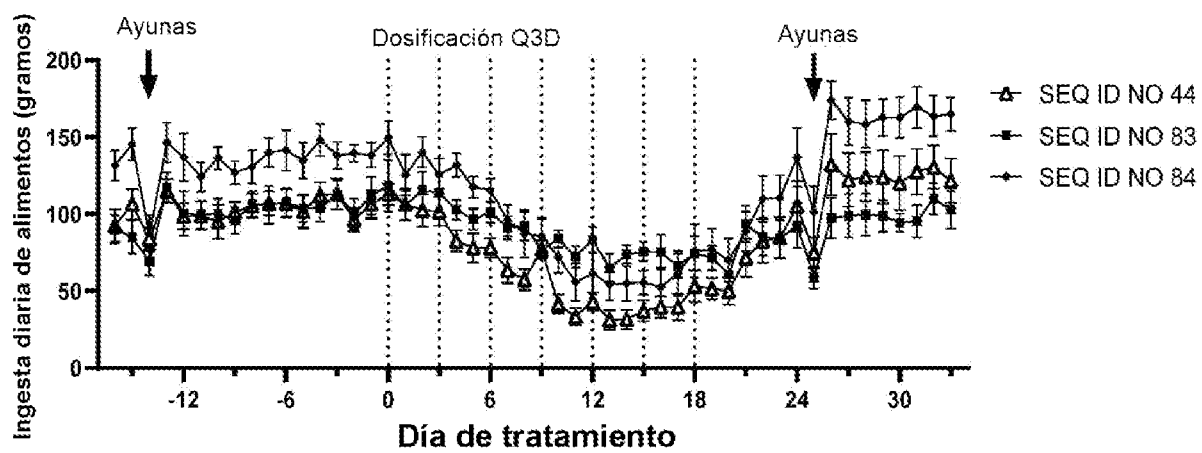


FIG. 19

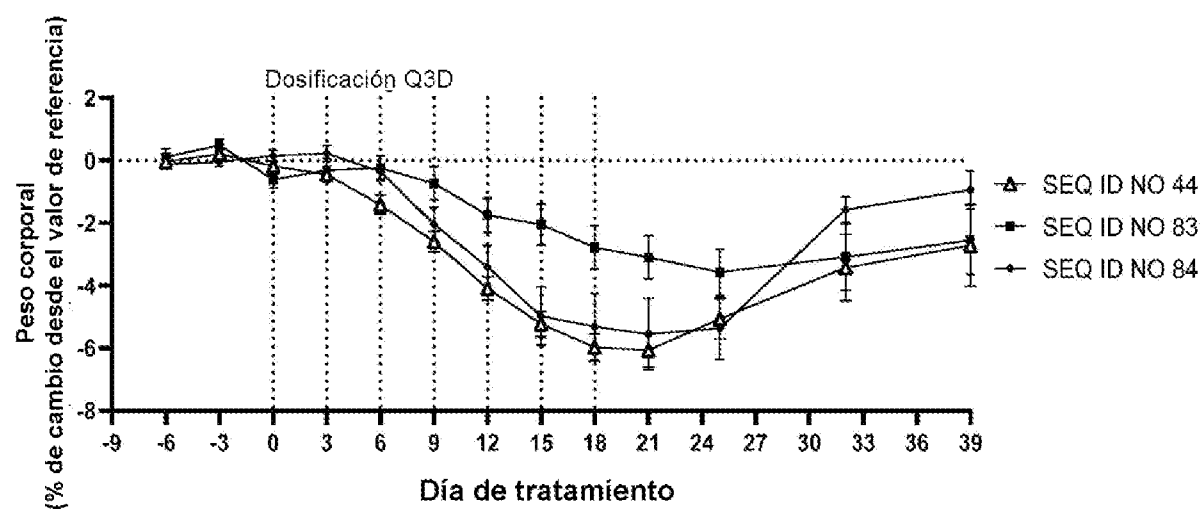


FIG. 20

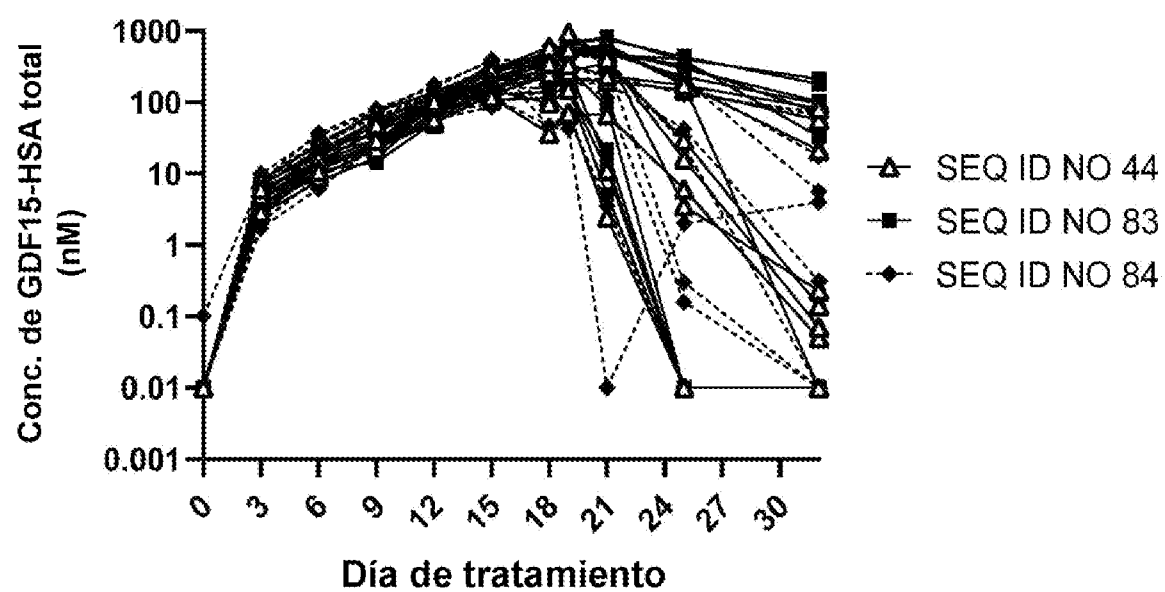


FIG. 21

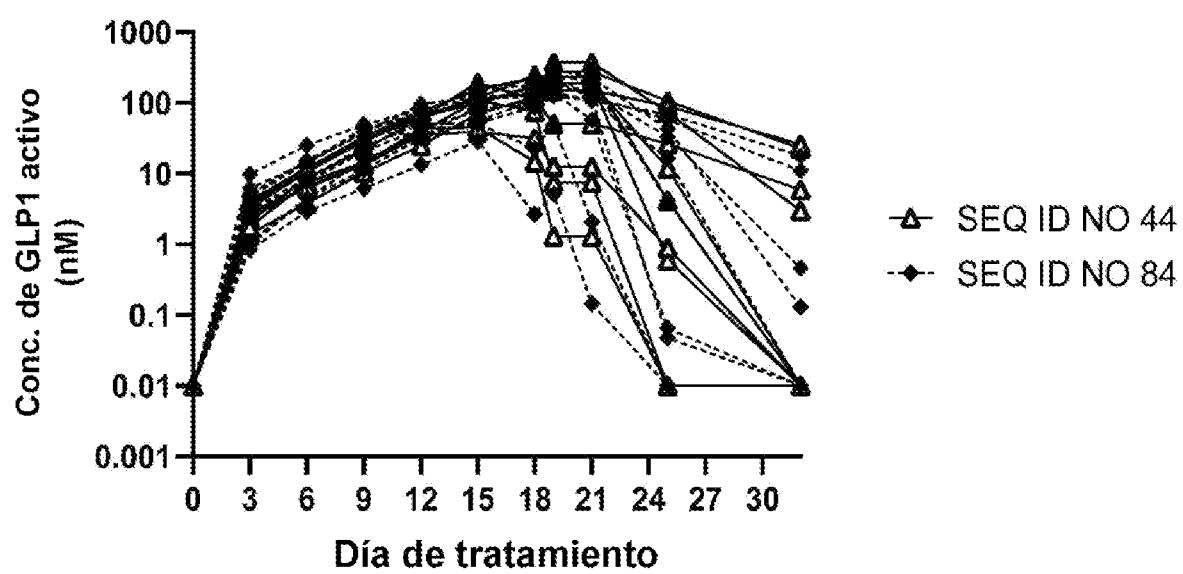


FIG. 22